

Veera Virolainen

# Gluteenifragmentit elintarvikkeista havaitsevan ELISA-menetelmän validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

8.5.2017

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Veera Virolainen Gluteenifragmentit elintarvikkeista havaitsevan ELISA- menetelmän validointi 41 sivua + 1 liite 8.5.2017
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede/Biotekniikka
Ohjaaja(t)	Kemisti Markku Myllylä Lehtori Eija Koriseva Lehtori Carola Fortelius
<p>Tämän insinööritoiminnan toimeksiantaja oli Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry:n (KVVY ry) Porin yksikkö. Työn tarkoituksena oli validoida uusi, gluteenia elintarvikkeista tunnistava, analyysimenetelmä jo olemassa olevan menetelmän rinnalle.</p> <p>Uuden menetelmän pitäisi antaa tarkempia tuloksia fermentoituja tai hydrolysoituja elintarvikkeita analysoitaessa. Menetelmässä näytteen gluteenipitoisuutta mitattiin Tecan Sunrise -fotometrillä. Työ suoritettiin R-Biopharm Ridascreen® Gliadin competitive -kitillä. Validoinnin avulla pyrittiin varmistamaan menetelmän toimivuus akkreditointia varten. Menetelmän toivottiin parantavan tulosten tarkkuutta vanhaan menetelmään verrattuna.</p> <p>Työn kokeelliseen osuuteen kuului työsuorituksen optimointi valituilla neljällä erityyillisellä olutnäytteellä ja työn toistaminen tilastollisen datan aikaansaamiseksi. Lisäksi menetelmän työohjeen kääntäminen suomen kielelle ja muokkaaminen sekä koulutuspäivän pitäminen laboratorion henkilökunnalle kuuluivat työhön. Kirjallisessa osuudessa tutustuttiin validoitavaan menetelmään ja sen periaatteisiin sekä menetelmän tutkimuskohteeseen, gluteeniin, ja siihen olennaisesti liittyvään keliakiaan.</p> <p>Yritykselle tehtiin validointisuunnitelma. Validoinnissa tarkasteltiin mittausaluetta, lineaarisuutta, herkkyyttä, toteamis- ja määritysrajoja, tarkkuutta sekä täsmällisyyttä ja toistettavuutta. Lopuksi tehtiin raportti, jossa laskettiin tulokset ja arvioitiin työn onnistumista.</p> <p>Työn tavoitteet saavutettiin hyvin. Insinööritoiminnan tuloksena menetelmästä saatiin kerättyä tarpeeksi tilastodataa validoinnin tekemiseen. Havaittiin, että olutnäytteet 1 ja 2 ovat gluteenipitoisuuksiltaan lähellä toisiaan ja lähellä toteamisrajaa. Nämä kaksi näytettä voitiin todeta gluteenittomiksi. Näyte 4 ylitti määritysalueen moninkertaisesti, joten parhaaksi näytteeksi validointia varten osoittautui olutnäyte 3. Näytteen 3 tilastodatalle tehdyn tarkastelun päätteeksi voitiin todeta, että tulokset osoittivat menetelmän tuovan haluttua tarkkuutta fermentoitujen oluiden gluteenipitoisuuden tutkimiseen. Nytemmin menetelmä on akkreditoitu ja otettu käyttöön yrityksessä. Validoinnin lisäksi työohje käännettiin onnistuneesti ja koulutuspäivä pidettiin henkilökunnalle suunnitellusti.</p>	
Avainsanat	Gluteeni, gliadiini, competitive ELISA, validointi, gluteenifragmentit, keliakia, vasta-aine

Author Title Number of Pages Date	Veera Virolainen Validation of ELISA procedure for detecting gluten fragments from food 41 pages + 1 appendices May 8 <sup>th</sup> 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biotechnology
Instructor(s)	Markku Myllylä, Chemist Eija Koriseva, Lecturer Carola Fortelius, Lecturer
<p>This thesis was commissioned by the Pori Department of the Water Protection Association of the River Kokemäenjoki (KVVY). The aim of the thesis was to validate a new analysis method that recognizes gluten in food to be used side by side with an already existing method. The new method should give more accurate results when analyzing fermented or hydrolyzed food. When analyzing this method, the gluten concentration of a sample was measured with a Tecan Sunrise photometer. Analyzes were accomplished with Ridascreen® Gliadin competitive kit by R-Biopharm. The aim of validation was to ensure the operability of the method in order to accredit it. It was desired that the new method would improve the accuracy of results compared to those of the old method.</p> <p>The experimental part of the work consisted of optimizing the working protocol with 4 different types of beer samples chosen and repeating the protocol to produce statistical data. In addition, the experiment consisted of modifying and translating the work instructions into Finnish and holding an education day for the staff. In the theory part, the method of validation and its principles were explored. Also gluten and coeliac disease were familiarized with.</p> <p>A validation plan was made for the association. During validation, area of measurement, linearity, sensitivity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, precision and repeatability were examined. At the end of the validation, a validation report was made in which the results were calculated and the successfulness of the validation was evaluated.</p> <p>The aim of the thesis was achieved. Enough statistical data was collected to perform the validation. It was discovered that Beer Sample 1 and 2 were near each other by their gluten content and both were near the LOD. These two were deemed as gluten free. Sample 4 exceeded the area of quantification multiple times; therefore, the best sample to use in validation was shown to be Sample 3. After handling the statistical data of Sample 3, it could be concluded from the results that the new method has the wanted accuracy when analyzing the gluten concentration of fermented beers. The method has been accredited and brought into use in society. Besides validation, the work instructions were translated successfully and an education day for the staff was held as planned.</p>	
Keywords	gluten, gliadin, competitive ELISA, validation, gluten fragments, coeliac disease, antibody

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Gluteeni	3
2.1	Gluteenin koostumus	3
2.2	Keliakia	4
2.3	Gluteeni elintarvikkeissa	6
2.4	Gluteenittomien tuotteiden valvonta	8
2.5	Allergeenitutkimus	8
3	ELISA	10
3.1	Elisa-menetelmät	10
3.1.1	Suora ELISA	10
3.1.2	Epäsuora ELISA	11
3.1.3	Sandwich ELISA	11
3.2	Vasta-aineet gluteenitutkimuksessa	12
3.3	Gluteenifragmentit	13
3.4	Competitive ELISA	14
4	Validointi	17
4.1	Osana laatujärjestelmää	17
4.2	Tutkittavat validointikriteerit	18
5	Tarkoitus ja tavoitteet	20
6	Materiaalit ja menetelmät	20
6.1	Näytteet	20
6.2	Kitti	21
6.3	Laitteet	22
6.4	Vertailukoenäytteet	22
6.5	Työn esivalmistelut	23
6.5.1	Kalan gelatiiniliuoksen valmistus	23
6.5.2	Näytteiden esikäsittely	23
6.5.3	Kitin sisältämien liuosten laimentaminen	23

6.5.4	Pipetointikartan ja tietokoneen valmistelu	24
6.6	Mittaukset	25
7	Tulosten käsittely ja esittely	27
7.1	Tulosten käsittely Excelissä	27
7.2	Validoinnin tulokset	30
8	Johtopäätökset	37
	Lähteet	39

Liite 1 Analyysin raakadata

## Lyhenteet

FINAS	Finnish accreditation service. Suomen akkreditointipalvelu.
EVIRA	Elintarviketurvallisuusvirasto.
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay. Immunologinen, vasta-aineisiin perustuva analyysimenetelmä.
HLA	Human Leukocyte Antigen. Tietty peptidirakenne, joka toimii reseptorina antigeenia esittelevän solun pinnalla. HLA DQ -reseptorit ovat yhdistetty keliakian syntyyn.
AOAC	The association of analytical communities. Kansainvälinen, itsenäinen, voittoa tavoittelematon yhdistys, jonka tehtävänä on kehittää mikrobiologian ja kemian standardimenetelmiä.
FDA	Food and Drug administration on osa Yhdysvaltojen terveysvirastoa. Sen tehtävänä on valvoa ihmisten ja eläinten lääkkeitä, tupakkatuotteita sekä elintarvikkeita.
AACCI	The American Association of Cereal Chemists International. Kansainvälinen, voittoa tavoittelematon organisaatio, jonka tavoitteena on lisätä tietoisuutta viljan tieteellisestä tutkimuksesta tutkimuksen, koulutuksen ja teknisten palveluiden avulla.
LOD	Limit of detection. Toteamisraja.
LOQ	Limit of quantification. Määritysraja.
MUkit	Measurement Uncertainty Kit. Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) kehittämä tietokoneohjelma mittausepävarmuuden laskemiseksi.

## 1 Johdanto

Tämän insinööritoimiston toimeksiantaja oli Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry:n (KVVY ry) Porin yksikkö. KVVY ry on voittoa tavoittelematon, vuonna 1961 perustettu yhdistys, jonka tavoitteena on tarjota laadukkaita ja monipuolisia laboratoriopalveluita asiakkailleen. Laboratorio on FINAS-akkreditointipalvelun akkreditoima testauslaboratorio T064 (SFS-EN ISO 17025:2005). Laboratoriolla on myös monia Elintarviketurvallisuusvirasto EVIRA:n myöntämiä hyväksyntöjä. Sen analyysivalikoimaan kuuluu mikrobiologia, kemiallisia ja aistinvaraisia menetelmiä. [1.]

Yksi laboratorion tarjoamista analyyseistä on gluteenin määrittäminen elintarvikkeesta ELISA-menetelmällä. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) on entsyymivälitteinen, immunologinen määrittäminen, jolla voidaan havaita antigeeni tai vasta-aine biologisessa näytteessä. Laboratoriolla on käytössä tähän tarkoitettu, sandwich ELISA:an perustuva, R-biopharmin Ridascreen® Gliadin -kitti. Menetelmä perustuu Codex Alimentariuksen hyväksymään R5-vasta-aineeseen (Mendezin menetelmä). Kittä on suunniteltu käytettäväksi useimpien elintarvikkeiden kanssa. Laboratorio tahtoi kuitenkin sen rinnalle saman valmistajan Ridascreen® Gliadin competitive -kitin, joka on suunniteltu erityisesti hydrolysoitujen ja fermentoitujen elintarvikkeiden analysoimiseen. Myös tämän kitin perustana on R5-vasta-aine, mutta menetelmänä on competitive ELISA.

Gluteeni on valkuaisaine, jota esiintyy vehnässä, rukiissa, ohrassa sekä näiden hybridi-lajikkeissa. Gluteenia käytetään laajalti elintarvikkeissa, sillä se parantaa mm. elintarvikkeen rakennetta. Lisäksi luonnostaan gluteenittomat tuotteet kontaminoituvat herkästi gluteenilla valmistuksen ja kuljetuksen aikana huolimattoman käsittelyn vuoksi. Keliakia on autoimmuunisairaus, jossa henkilöllä on pysyvä intoleranssi gluteenille. Hoitokeino on pysyvä gluteeniton ruokavalio. Pienikin määrä jatkuvasti nautittuna voi olla sairastaville haitallista. Tämä vuoksi gluteenin määrä on ilmoitettava pakkausmerkinnöissä.

Tavallisten elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden mittaamiseen sandwich ELISA on luotettava analyysimenetelmä. Sandwich ELISA -menetelmää käytettäessä on kuitenkin huomattava, että näytteen gluteeniketjujen tulee olla tarpeeksi pitkiä, jotta ne havaitaan. Kun elintarviketta käsitellään hydrolysoimalla tai fermentoimalla, pilkkoutuu niissä oleva gluteeni lyhyemmiksi ketjuiksi. Tällöin isoja määriä pienempiä proteiinifragment-

teja voi jäädä havaitsematta, vaikka niitä olisi näytteessä. Tällaisia tilanteita varten on kehitetty tässä työssä käytettävä Ridacreen® Gliadin competitive -ELISA-kitti.

Työn tarkoituksena oli validoida gluteenia elintarvikkeista tunnistava, uusi analyysimenetelmä jo olemassa olevan menetelmän rinnalle. Uuden menetelmän pitäisi antaa tarkempia tuloksia fermentoituja tai hydrolysoituja elintarvikkeita analysoitaessa. Laboratoriot vastaavat analyysimenetelmiensä laadun varmistamisesta validoimalla menetelmiä ja laitteita. Validoinnilla tarkoitetaan menetelmän tai laitteen testausta, jolla varmistetaan sen soveltuvuus tarkoitukseensa.

Työn suoritukseen käytettiin kitin lisäksi Tecanin Sunrise-fotometriä ja Hydroflex-pesuria sekä Tecanin Magellan-ohjelmistoa, joita käytettiin myös jo käytössä olevassa gluteenianalyysissä. Validointia varten valittiin neljä olutta, joiden gluteenipitoisuuksien toivottiin eroavan toisistaan. Tarkoituksena oli löytää yksi olut, jonka gluteenipitoisuus olisi lähellä analyysin määrittärajaa, yksi olut, joka sijoittuisi määrittäalueelle, ja yksi olut, jonka pitoisuus olisi lähellä määrittäalueen yläpäättä.

Validointia varten tehdystä analyysin optimoinnista kerättiin tilastodataa, josta haluttiin selvittää joitain analyysin suorittamisen laatuun vaikuttavia tekijöitä. Nämä tekijät ovat validoinnin vähimmäisvaatimuksia, kun menetelmä halutaan akkreditoida. Tekijöitä olivat mittausalue, lineaarisuus, herkkyys, toteamis- ja määrittärajat, tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus sekä mittausepävarmuus. Menetelmän toivottiin parantavan tulosten tarkkuutta vanhaan menetelmään verrattuna. Validoinnin lisäksi insinööritööhön kuului menetelmän työohjeen kääntäminen suomen kielelle ja muokkaaminen, sekä koulutuspäivän pitäminen laboratorion henkilökunnalle.



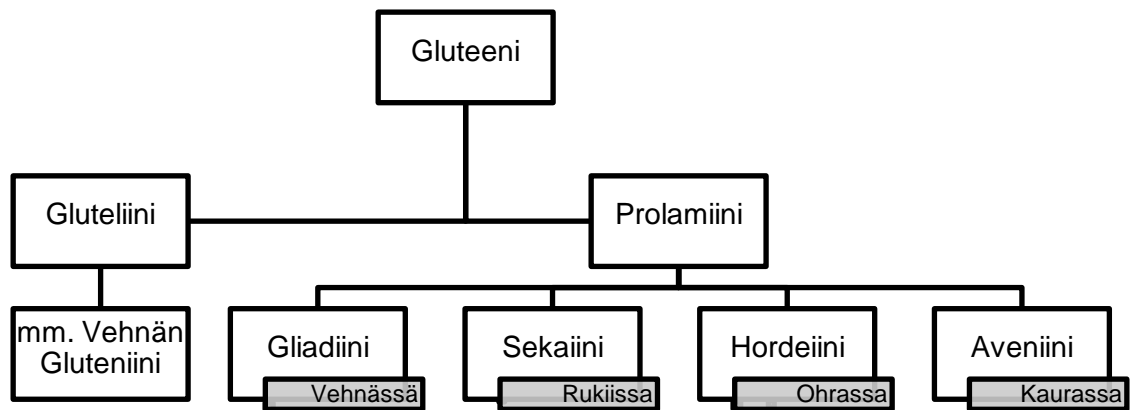
## 2 Gluteeni

Gluteeni on valkuaisaine, jota esiintyy vehnässä, rukiissa ja ohrassa sekä näiden hybridilajikkeissa. Myös kaura voi sisältää gluteenia lajikkeesta riippuen tai ristikontaminaation vuoksi. [2.] Ristikontaminaatiolla tarkoitetaan elintarvikkeiden saastumista mikrobeilla tai sille vierailta aineilla, tässä tapauksessa gluteeniproteiineilla. Kauran kontaminaatio gluteenilla johtuu yleisimmin sen viljelystä samassa pellossa, jossa gluteenia sisältäviä viljoja on viljelty aiempina vuosina. Jos maaperää ei ole valmisteltu puhtasviljelyä varten, on todennäköistä, että viljellyn kauran joukossa kasvaa myös muiden viljalajikkeiden yksilöitä. Nämä kontaminoivat koko kaurasadon. Toinen yleinen kontaminaationlähde on kauran käsittely teollisuudessa, jossa samalla linjastolla tuotetaan myös muista viljoista valmistettavia elintarvikkeita.

### 2.1 Gluteenin koostumus

Gluteeni on viljan varastoproteiini, ja se sijaitsee viljakasvin jyvän ytimessä tärkkelyksen kanssa. Jyvässä on valkuaisainetta noin 10–15 % ja loppu on tärkkelystä. Suurin osa viljan hyötykäytöstä kohdistuu juuri viljan jyvään. [3.]

Gluteeni koostuu prolamiini- ja gluteliini-proteiineista [4]. Prolamiinit ovat alkoholiin liukenevia kun taas gluteliinit eivät. Eri lajikkeilla esiintyviä prolamiineja kutsutaan eri nimillä: gliadiini (vehnä), sekaliini (ruis), hordeiini (ohra) ja aveniini (kaura). [2.] Gluteenia sisältäviä viljoja käytetään erittäin paljon elintarviketeollisuudessa. Erityisesti vehnä on yksi maailman yleisimmistä ravinnonlähteistä [5]. Kuvassa 1 on esitetty gluteenin koostumus.



Kuva 1. Gluteenin koostumus. [Mukaillen 2 ja 4]

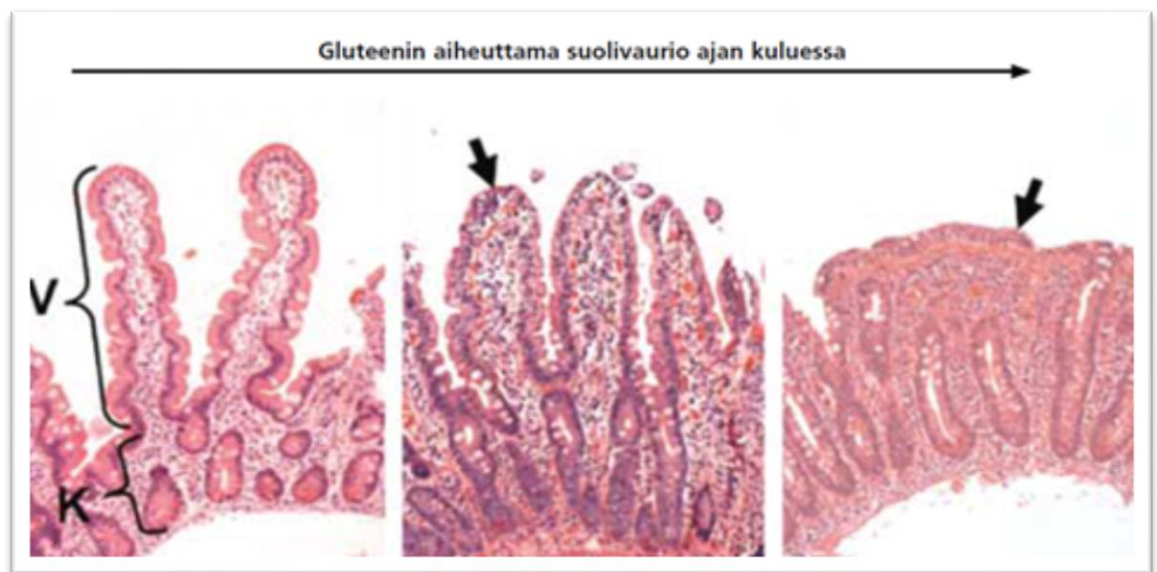
Prolamiinit ovat monomeereja eli pieniä molekyylejä, ja ne voidaan jakaa  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ja  $\omega$ -tyyppeihin [2]. Esimerkiksi  $\alpha$ -tyypin prolamiineja esiintyy muita enemmän vehnässä. Omega-tyypin prolamiineja esiintyy vehnän lisäksi myös rukiissa ja ohrassa. Kyky tunnistaa useampia viljalajeja on tärkeä ominaisuus gluteenitutkimuksessa, ja  $\omega$ -gliadiini onkin ollut käytössä jo kauan gluteenitutkimuksessa. [3.] Gluteliinit ovat isompia, useiden prolamiinimolekyylien kokonaisuuksia. Gluteniini on yksi yleisimmistä gluteliinin muodoista, ja sitä esiintyy runsaasti etenkin vehnässä. [2.] Prolamiineista tutkituin on vehnän gliadiini, johtuen sen laajasta käytöstä elintarvikkeissa. Kaikki prolamiinityypit ja gluteliinit ovat haitallisia keliakiaa sairastaville. Tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että etenkin gliadiinin  $\alpha$ -tyyppiset peptidirakenteet, jotka sisältävät runsaasti prolamiinia ja glutamiinia, aiheuttavat keliakiaa. [2; 3]

## 2.2 Keliakia

Keliakia on ohutsuolen limakalvojen sairaus, jossa henkilöllä on pysyvä intoleranssi gluteenille [6]. Keliakiassa gluteeni pääsee sitoutumaan ohutsuolen antigeeniä esittelevien solujen pinnalla oleviin tiettyihin HLA DQ -reseptoreihin. Niiden tehtävänä on esitellä solunulkoisia peptidejä imusoluille. T-solut tunnistavat DQ-reseptoriin sitoutuneen vieraan peptidin aiheuttaen ohutsuolen limakalvolla tulehduksen ja suolinukan vaurioitumisen. [3.] Keliakikon ohutsuolen pinta surkastuu ja suolen pinta-ala pienenee vähitellen. Tämä häiritsee ravintoaineiden imeytymistä merkittävästi. [2; 6] Tutkimukset

ovat osoittaneet, että lähes jokaisella keliakiaa sairastavalla ihmisellä on jompikumpi keliakiaan yhdistetty reseptori, DQ2 tai DQ8. Mikäli henkilöllä ei ole näitä reseptoreita, on keliakiaan sairastumisen mahdollisuus lähes olematon. [7.] Keliakian oireita ovat mm. erilaiset vatsa- ja iho-oireet sekä ravintoaineiden imeytymishäiriöt [6].

Keliakiaa ei kroonisuutensa vuoksi lueta allergiaksi, vaan se muistuttaa enemmänkin autoimmuunisairautta. Sairauteen ei ole olemassa pysyvää parannuskeinoa, mutta sen saa oireettomaksi noudattamalla tarkkaa gluteenitonta ruokavaliota. [8.] Kuvassa 2 esitetään gluteenin aiheuttamia vaurioita ohutsuolessa. Vasemmalla on terve ohutsuoli, jossa suolen pintaa peittävät nukkalisäkkeet. Suolinukkaa peittää vielä kerros mikroskooppisen kokoisia mikrovilluksia. Keskellä olevassa kuvassa suolinukka on alkanut rapautua, ja oikean puoleisessa kuvassa nukkalisäkkeet ovat surkastuneet kokonaan. [3; 9]



Kuva 2. Ohutsuolen suolinukka. Vasemmalla on terve ohutsuolenpinta. Keskellä nukkalisäkkeet ovat jo kärsineet hieman vaurioita. Oikealla on keliakikon surkastunut ohutsuolenpinta. [9.]

Keliakiaa pidettiin aiemmin harvinaisena tautina, sillä vain vakavasti oireilevat henkilöt osattiin diagnosoida. Nykyisin diagnoosin saa helpommin. Keliakiaa on Suomessa tutkittu paljon, ja on arvioitu, että väestöstä keliakiaa sairastaa noin 2 % (yli 100 000 henkilöä). Kuitenkin vain pieni osa, noin 36 000 henkilöä (2015) tautia sairastavista, on saanut diagnoosin. [10.] Keliakiatapausten määrä on kasvanut etenkin länsimaissa parissakymmenessä vuodessa jopa puolella [9].

Keliakian syntymekanismia ei vielä tunneta tarkasti. On kuitenkin pystytty toteamaan, että sen puhkeamiseen tarvitaan perinnöllinen alttius, gluteenin läsnäolo ja mahdollisesti vielä jokin muu, tuntematon tekijä. [11.] Arvellaan, että kyseessä voisi olla jokin ympäristötekijä, kuten esimerkiksi stressi, infektio tai ruoansulatuselimistön mikrobiflooran muutos [12]. Ympäristötekijöiden vaikutusta keliakian esiintymiseen pidetäänkin merkittävänä [9].

### 2.3 Gluteeni elintarvikkeissa

Gluteenia sisältävistä viljoista etenkin vehnää käytetään yleisesti elintarvikkeissa johtuen sen monista positiivisista vaikutuksista tuotteen rakenteeseen, viskoosisuuteen, kosteuden säilymiseen ja makuun [4; 12]. Gluteenia käytetään paljon myös sen halvan hinnan vuoksi. Tämä johtuu siitä, että tärkkelystä valmistettaessa muodostuu sivutuotteena gluteenia, jolle ei muutoin olisi käyttöä. [12.]

Gluteenia on tutkittu paljon, ja sen ominaisuuksien vuoksi sitä on alettu käyttää muissakin kuin viljatuotteissa [12]. Euroopassa käyttö rajoittuu leivottujen tuotteiden lisäksi jauhorikasteisiin ja eläintenruokiin. Näissä tuotteissa gluteenia on jo valmiiksi. Muualla maailmassa, kuten Japanissa, Australiassa ja Amerikassa, gluteenia lisätään myös moniin sellaisiin tuotteisiin, joissa ei luontaisesti sitä olisi. Tällaisia tuotteita ovat mm. lihat, juustot, maidonkorvikkeet, maissista tehdyt aamiaismurot ja urheilujuomat. [13.] Tällaisten tuotteiden yleistymisen on aiheuttanut huolta niin tutkijoissa kuin kuluttajissa, minkä vuoksi tutkijat ovat alkaneet kehittää uusia keinoja gluteenin allergisuuden vähentämiseksi [12; 13].

Gluteenin käyttö elintarvikkeissa on siis lisääntynyt, mutta toisaalta parantunut keliakian diagnosointi ja ravitsemustietoisuus ovat muodostaneet uuden, ruokavaliostaan tarkan kuluttajaryhmän. Keliakikot ovat kiinnostuneita löytämään uusia monipuolisempia vaihtoehtoja gluteenittomaan ruokavalioonsa. Ennen gluteenia sisältävien ruokien välttely oli ainoa vaihtoehto, mutta nykyään markkinoilla on suuri määrä tavallisten tuotteiden kaltaisiksi kehitettyjä gluteenittomien tuotteita. Näiden erityisruokavaliotuotteiden valikoima on nykyisin monipuolinen, ja tuotteita tarjoavat lähes kaikki elintarvikkeita myyvät kaupat.

Elintarvikkeiden sisältämistä, EVIRAn listaamista allergeeneista tulee ilmoittaa pakkausmerkinnällä. Toisaalta monet yritykset mainostavat oman tuotteensa gluteenitto-

muutta. Gluteenittomat tuotteet tunnistaa Suomessa gluteenittoman tuotteen merkistä, ”gluteeniton”-merkinnästä tai ainesosaluetteloa tarkastelemalla [14]. Monissa liikkeissä gluteenittomat tuotteet on kerätty samaan hyllyyn tuotteiden löytämisen helpottamiseksi. Lisäksi osa etenkin leipomotuotteista löytyy pakasteesta.



Kuva 3. Keliakialiitto ry:n gluteenittoman tuotteen merkki [15].

Keliakialiitto valvoo Suomessa käytössä olevaa gluteenittoman tuotteen merkkiä, joka on esitetty kuvassa 3. Merkin ideana on, että kuluttaja näkee tuotteen gluteenittomuuden nopealla vilkaisulla eikä pakkausmerkintöjen tutkimiseen kulu enää suhteettomasti aikaa. Tällä hetkellä merkin käyttöoikeuden on saanut 330 tuotetta. [15.]

Merkin käyttöoikeutta voi hakea keliakialiitolta kahdeksi vuodeksi kerrallaan. Ollakseen oikeutettu käyttämään tuotteestaan nimitystä ”gluteeniton” on yrityksellä oltava toimiva omavalvontasuunnitelma, pakkausmerkintöjen on oltava lainmukaisia ja merkkiä varten keliakialiitolle on toimitettava analyysitodistus gluteenittomuudesta. [16.] Analyysitodistuksen saadakseen on yrityksen tutkittava näyte EVIRA:ssa tai vastaavassa, hyväksytyssä, akkreditoidussa laboratoriossa.

Suomessa on n. 40 EVIRAn hyväksynnän saanutta laboratoriota. Hyväksytyjen analyysien määrä vaihtelee laboratorioittain, sillä jokaiselle menetelmälle tulee erikseen hakea hyväksyntä. Hyväksyntä myönnetään lähes automaattisesti FINAS-akkreditoidulle menetelmälle. Tämän jälkeen laboratoriot voivat analysoida elintarvikkeiden viranomaistutkimusten ja lakisääteisten omavalvontatutkimusten näytteitä käyttäen akkreditoitija analyysimenetelmiään. [17; 18] Näistä 40 laboratoriota vain muutama analysoi gluteenia.

## 2.4 Gluteenittomien tuotteiden valvonta

Elintarvikevalvonnan tehtävänä on varmistaa elintarvikkeiden turvallisuus, laatu ja pakkausmerkintöjen oikeellisuus [19]. Komission täytäntöönpanoasetuksella (EU) N:o 828/2014 säädetään keliakikoille soveltuvien elintarvikkeiden koostumuksesta ja pakkausmerkinnöistä. Asetus perustuu kansainväliseen Codex Alimentarius -standardiin (Codex Stan 118–1979). Se on velvoittava kokonaisuudessaan, ja kaikki Euroopan unionin jäsenvaltiot soveltavat sitä. Keliakikoille sopivat elintarvikkeet jaotellaan gluteenittomiin ja vähägluteenisiin tuotteisiin. Gluteeniton tuote saa sisältää gluteenia enintään 20 mg/kg ja vähägluteeninen tuote 20–100 mg/kg. [20.]

Suomen elintarvikeketjun valvonta perustuu eri tahojen yhteistyöhön. Elintarvikevalvonnasta vastaa EVIRA yhdessä kuntien kanssa. Kunnissa valvonnasta vastaavat terveysvalvojat tai muut elintarvikevalvojat, joita aluehallintovirasto ohjaa. Tulli valvoo Suomeen tulevia, ei-eläinperäisiä elintarvikkeita. Eläinperäisiä elintarvikkeita valvoo EVIRA. Suomessa toimivat elintarvikeyritykset vastaavat tuotteittensa turvallisuudesta, ja valvovat tuotantoaan omavalvonnan avulla. [19.] EVIRA seuraa monivuotisen kansallisen valvontasuunnitelman (VASU) toteutumista vuosittain ja raportoi sen toteutumisesta Euroopan komissiolle [21].

## 2.5 Allergeenitutkimus

Ruoka-allergioista puhuttaessa allergeeneiksi kutsutaan niitä ruoan proteiineja, joita vastaan henkilön immuunipuolustuksen vasta-aineet hyökkäävät. Allergiassa puolustusjärjestelmä puolustautuu turhaan ja liian voimakkaasti keholle harmittomiakin aineita vastaan. Suomessa ruoka-aineallergikkoja on 2–4 % aikuisista ja 5–10 % lapsista. Intoleranssilla tarkoitetaan muita kuin allergiasta johtuvia yliherkkyysoireita esim. keliakiaa ja laktoosi-intoleranssia. Näissä sairauksissa henkilön immuunipuolustus hyökkää kehon omia kudoksia vastaan. [22.]

Allergeeneja analysoitaessa ollaan yleensä kiinnostuneita siitä, onko näytteessä etsittyä allergeenia vai onko se kyseisen allergeenin osalta puhdas. Tätä samaa tarkastellaan myös gluteenia tutkittaessa. Gluteeni on proteiini, eikä sillä näin ollen ole DNA:ta. Tämän vuoksi usein allergeenien testauksessa käytetty PCR ei ole gluteenille soveltuva tutkimusmenetelmä. [23.] Gluteenin havaitsemista hankaloittaa myös sen prolamiini-

nien kemiallinen monimutkaisuus, joka tekee niistä hankalia tunnistaa. Gluteenin spesifinen havaitseminen on siten mahdollista lähinnä immuunimäärityksillä (ELISA). [24.]

Sandwich ELISA on käytetyin analyysimenetelmä, kun tutkitaan prolamiinien määrää näytteessä [30]. Näytteen gluteenipitoisuutta on myös mahdollista tutkia immunokromatografisia pikatestejä käyttämällä. Tällöin tuloksena on kuitenkin lähinnä tieto siitä, esiintyykö näytteessä gluteenia vai ei, eikä tarkkaa gluteenimäärää. [23.]

Prolamiinien molekyylikokoa tutkittaessa käytetään menetelmänä SDS-PAGE:a ja immunoblottausta. Tällöin näytteiden analysointi on laadullista. [24.] SDS-PAGE eli natriumdodekyylisulfaatti polyakryyliamidi geielektroforeesi (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) on biokemiallinen menetelmä, jossa näytteen eristetyt proteiinit erotellaan toisistaan molekyylikoon mukaan sähkövirran avulla. SDS-etuliitteellä tarkoitetaan geeliasossa käytettävää ainetta, joka antaa näyteproteiineille varauksen ja estää niiden sekoittumisen ajon aikana. Vasta-ainetutkimusta varten proteiinit siirretään geeliltä sähkövirran avulla nitroselluloosakalvolle. Tätä kutsutaan immunoblottaukseksi.

Myös HPLC:tä voidaan käyttää prolamiinien tutkimiseen [24]. HPLC eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia (High-performance liquid chromatography) on menetelmä, jolla näytteen komponentit voidaan erotella, tunnistaa ja määritellä. Menetelmä perustuu siihen, että tutkittava aine laitetaan paineistettuun kolumniin, jossa näytteen molekyylit etenevät eri vauhdilla riippuen niiden koosta. Siten ne poistuvat kolumnista eri aikoihin, ja ne voidaan kerätä.

### 3 ELISA

ELISA eli Enzyme linked immunosorbent assay on kuoppalevypohjainen analyysiteknikka, jota käytetään pääasiassa immunologiassa proteiinien, kuten vasta-aineiden tai antigeenien, havaitsemiseen näytteestä. ELISA:ssa pitoisuudeltaan tuntematon näyte sidotaan kiinteään pohjamatriisiin, joko epäspesifisesti adsorbtiolla tai spesifisesti sitomalla se spesifiin vasta-aineeseen. Liikkumaton antigeeni muodostaa kompleksin vasta-aineen kanssa. Vasta-aineeseen voi olla sidottuna kovalenttisesti entsyymi tai vasta-aine voidaan tunnistaa toisella vasta-aineella, johon entsyymi on sidottu. Vaiheitten välillä levy pestään ylimääräisten tuotteiden poistamiseksi. [25;26]

Aineen havaitseminen tapahtuu tekemällä entsyymistä aktiivinen lisäämällä substraatti, jolloin inkuboitessa muodostuu mitattava tuote [25]. Signaali mitataan valitulle substraatille sopivalla menetelmällä (fotometrisesti, fluorometrisesti tai luminometrisesti). Yleensä entsyyminä käytetään joko piparjuuren peroksidaasia (HRP, horseradish peroxidase) tai alkaalifosfataasia (AP, alkaline phosphatase). Näiden kahden käytön yleisyyttä selittää niiden kanssa yhteensopivien substraattien laaja valikoima. ELISA-menetelmän onnistumisen kannalta on erittäin tärkeää varmistaa vasta-aine-antigeeni kompleksin erittäin spesifinen sitoutuminen. Siten vältetään ristiin sitoutumisen aiheuttamilta ongelmilta. [27.]

#### 3.1 Elisa-menetelmät

Yleisestä ELISA-menetelmästä on olemassa useita erilaisia variaatioita, jotka voidaan jakaa karkeasti suoraan, epäsuoraan ja sandwich ELISA:an. Nämä kolme eroavat toisistaan sitoutuvien komponenttien määrässä. [27.]

##### 3.1.1 Suora ELISA

Suora ELISA on vaihtoehtoisista yksinkertaisin. Kuoppalevyn kuopan pohjaan sidotaan antigeeni. Entsyymileimattu vasta-aine sitoutuu antigeeniin. Ylimääräinen vasta-aine pestään pois ja entsyymi aktivoidaan lisäämällä substraatti. Yksinkertaisuutensa ansiosta menetelmä on nopea, mutta ei yhtä joustava tai herkkä kuin muut menetelmät. [27.]



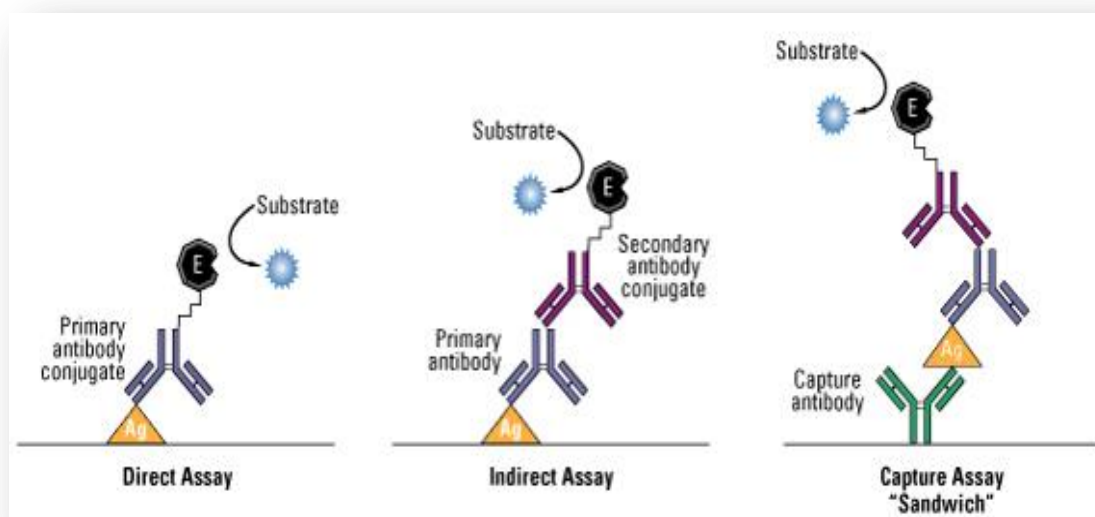
### 3.1.2 Epäsuora ELISA

Epäsuora ELISA alkaa samoin kuin suora ELISA. Kun antigeeni on sidottu kuopan pohjalle, lisätään vasta-aine. Tämä vasta-aine ei ole kuitenkaan entsyymileimattu, vaan ainoastaan spesifinen antigeenille. Tämän jälkeen lisätään toinen vasta-aine, joka on entsyymileimattu. Se sitoutuu aiemmin lisättyyn vasta-aineeseen, eikä antigeeniin, kuten suorassa ELISA:ssa. [27.]

### 3.1.3 Sandwich ELISA

Sandwich ELISA:ssa kuoppalevyn pohjaan on sidottu vasta-aine, johon antigeeni sitoutuu. Antigeenin toiseen sitoutumiskohtaan liittyy toinen, ensisijainen vasta-aine, johon on kiinnitetty entsyymi. On myös mahdollista, että entsyymi on sidottu vasta toissijaiseen vasta-aineeseen, joka sitoutuu ensisijaiseen vasta-aineeseen.

Monet kaupalliset kitit perustuvat sandwich ELISA -menetelmään, johtuen sen suuresta herkkyydestä ja kestävästä rakenteesta (tutkittava antigeeni jää kiinni kahden vasta-aineen väliin) [27]. Herkkyydeltään sandwich ELISA on 2–5 kertaa parempi kuin suora tai epäsuora ELISA [28]. Sandwich ELISA on myös hyvin joustava ja monipuolinen, sillä markkinoilta löytyy lukuisia erilaisia ensisijaisia vasta-ainevaihtoehtoja. Käyttämällä juuri oikeaa, tutkitulle antigeenille optimaalista vasta-ainetta, voidaan olla varmoja vasta-aineen korkeasta spesifisyydestä. [27.]



Kuva 4. Yleisimmät ELISA-menetelmät. Kuvassa vasemmalla esitetään suoran ELISA-menetelmän periaate. Keskellä vastaavasti epäsuora ELISA-menetelmä ja oikealla sandwich ELISA [27].

Kuten kuvassa 4 on esitetty, eroavat suora, epäsuora ja sandwich ELISA toisistaan rakenteellisesti. Suora ELISA -menetelmä on näistä yksinkertaisin. Epäsuorassa menetelmässä lisätään yksi vaihe lisää suoraan ELISA:n. Sandwich ELISA:ssa rakenneosien järjestys vaihtuu täysin. Kuoppalevyn pohjaan on sidottu vasta-aine, eikä antigeeni. [27.]

### 3.2 Vasta-aineet gluteenitutkimuksessa

Yleensä allergeenitutkimuksessa, jossa halutaan määrittää gluteenin määrä näytteessä, käytetään analyysimenetelmänä sandwich ELISA:a. Vaikka käytetty menetelmä on yleensä sama, on gluteenin tunnistukseen kuitenkin olemassa erilaisia vasta-ainevaihtoehtoja. Näistä kaksi on virallisten tahojen suosittelemia. Molemmat näistä ovat kaupallisesti saatavilla ja käytössä testauslaboratorioissa eri puolilla maailmaa. [29.]

The Association of Analytical Communities (AOAC) suosittelee käyttämään gluteenin havaitsemiseen näytteistä Skerrittin ja Hillin vuonna 1991 kehittämää  $\omega$ -gliadiinin tunnistavaan vasta-aineeseen perustuvaa sandwich ELISA:a. Codex Alimentarius on puolestaan suositellut vuodesta 2006 alkaen käytettäväksi R5-vasta-aineeseen perustuvaa sandwich ELISA:a. Molemmat tahot hyväksyvät molemmat menetelmät, mutta suositte-

levat ensisijaisesti eri menetelmiä. Myös FDA suosittelee R5-ELISA:n käyttöä. Verrattuna R5-vasta-aineeseen perustuvaan sandwich ELISA:an on vuonna 1991 huipputekniikkaa edustaneessa  $\omega$ -gliadiini sandwich ELISA:ssa useita puutteita. Sen herkkyys on R5-menetelmää huomattavasti huonompi ja se havaitsee vain  $\omega$ -gliadiinit, kun taas R5-menetelmällä havaitaan myös  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -gliadiinit. [29; 30]

Sandwich ELISA -menetelmää, jossa käytetään monoklonaalista eli yhdelle kohteelle spesifistä R5-vasta-ainetta, kutsutaan Mendezin menetelmäksi, sen kehittäneen filosofian tohtori Enrique Mendezin mukaan [30]. Menetelmä perustuu R5-vasta-aineeseen, joka on spesifinen gliadiini-antigeenin aminohappoketju-epitopille QQPFP (glutamiini–glutamiini–proliini–fenyyialaniini–proliini). QQPFP-jakso toistuu jatkuvasti kaikkien viljalajikkeiden gluteeniproteiinien prolamiineissa, minkä takia vasta-aine on spesifinen vehnän lisäksi myös muille gluteenia sisältäville viljoille. [4; 31]

R5-vasta-aineeseen perustuvaa tutkimusmenetelmää käytetään paljon Euroopassa. USA:ssa  $\omega$ -gliadiini-menetelmällä on sen sijaan vielä vahva jalansija. [29.] Markkinoille on myös tullut japanilaisen työryhmän kehittämä Morinaga-vehnä sandwich ELISA -menetelmä, jossa vasta-aine on polyklonaalinen eli spesifinen useammalle saman antigeenin epitopille. Menetelmä on herkempi kuin kaksi muuta mainittua, mutta ei yhtä spesifinen. [30.]

### 3.3 Gluteenifragmentit

Sandwich ELISA -menetelmä vaatii toimiakseen kaksi sitoutumiskohtaa, eli kaksi QQPFP-jaksoa, näytteen antigeeneissa. Toiseen sitoutumiskohtaan sitoutuu kuopan pohjalle kiinnitetty vasta-aine, ja toiseen ensisijainen vasta-aine. Tämä kahden sitoutumiskohdan vaatimus vaikeuttaa gluteenin havaitsemista elintarvikkeista, jotka on hydrolysoitu tai fermentoitu valmistusprosessin aikana. [4; 29]

Hydrolysoimisella tarkoitetaan elintarvikkeista puhuttaessa orgaanisten yhdisteiden pilkkomista yksinkertaisempaan molekyyliinmuotoon. Tämä tapahtuu yleensä entsyymien avulla. Esimerkiksi proteiinit hajotetaan peptideiksi ja edelleen aminohapoiksi. Hydrolyysissä pelkistävänä aineena on usein vesi. Fermentoiminen on mikrobien (hiivat, bakteerit) avulla tapahtuva käymisreaktio, jossa elintarvikkeen hiilihydraatit muuttuvat hapettomissa oloissa alkoholiksi. Perustana on mikrobien soluhengitys, jossa tietyt lajit muodostavat hapettomissa oloissa sokerin sijasta alkoholia. Kuvassa 5 on havainnollis-

tettu, kuinka elintarvikkeen hydrolysoiminen tai fermentoiminen pilkkoo gluteeniproteiinin siten, että sen havaitseminen vaikeutuu.

aaaaaaaQQPFPaaaQQPFPaaaaaaaaaaaaaQQPFPaaaaaQQPFPaaa

1. aaaaaaaQQPFP
2. aaaQQPFPaaaaaaaaaaaaa
3. QQPFPaaaaaQQPFPaaa

Kuva 5. Ylhäällä esitettynä eräs gluteeniketju, joka fermentoitaessa tai hydrolysoitaessa hajoaa fragmenteiksi 1,2 ja 3. Sandwich ELISA -menetelmää käytettäessä vain fragmentti 3 voitaisiin tunnistaa, sillä se on ainoa jossa QQPFP-ketju toistuu kahdesti. Sandwich ELISA:ssa antigeeni jää kahden vasta-aineen väliin, joille molemmille täytyy olla oma sitoutumiskohdansa. [mukaillen 31]

Hydrolysoituja ja fermentoituja elintarvikkeita valmistettaessa niiden proteiinit hajoavat pienempiin osiin, peptideiksi. Kokonaisissa gluteeniketjuissa QQPFP-jakso esiintyy vaihtelevia kertoja, kuitenkin melko usein. Hajotessaan fragmenteiksi satunnaisista kohdista QQPFP-ketjujen määrä fragmenteissa ei jakaudu tasaisesti, kuten voidaan huomata kuvan 5 esimerkistä. Hajoamisen tuloksena elintarvikkeessa on erikokoisia peptidifragmentteja, joista monessa QQPFP-jakso esiintyy vain kerran. Nämä pienet gluteenifragmentit ovat edelleen vahingollisia keliakiaa sairastaville. [4; 29]

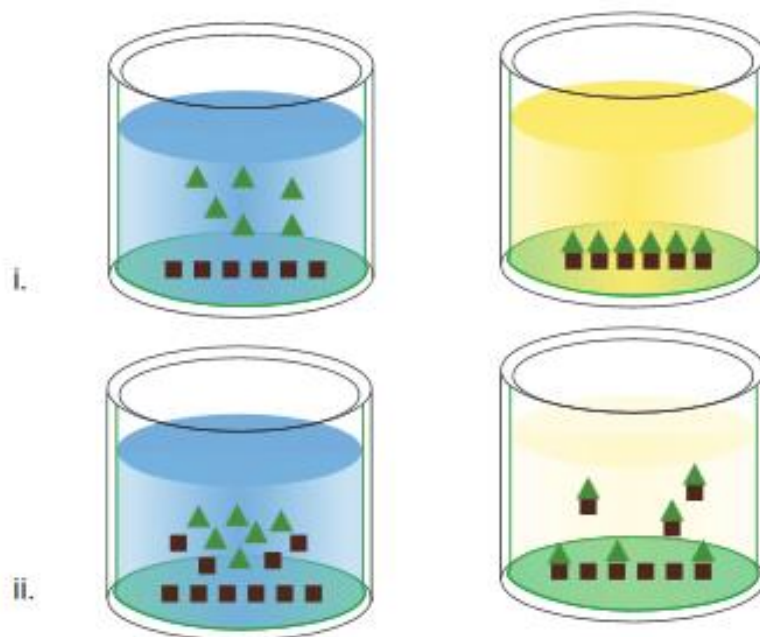
Tällaisten elintarvikkeiden gluteenipitoisuutta analysoitaessa on tärkeää havaita myös pienemmät proteiinifragmentit eli peptidit, joita elintarvike saattaa sisältää. Vaikka sandwich ELISA -menetelmä ei pysty havaitsemaan yhden QQPFP -jakson sisältäviä peptideitä, on se edelleen käytetyin menetelmä analysoitaessa gluteenipitoisuutta hydrolysoiduista ja fermentoiduista elintarvikkeista. Tällaisia näytteitä varten on nyt kehitetty vaihtoehto: competitive ELISA -menetelmä, joka vaatii toimiakseen vain yhden sitoutumiskohdan. [4; 29]

### 3.4 Competitive ELISA

Competitive ELISA -menetelmä havaitsee näytteestä pidempien prolamiiniketjujen lisäksi prolamiinin peptidifragmentit. Käytetty monoklonaalinen R5-vasta-aine tunnistaa näytteestä mahdollisesti toksisen QQPFP-sekvenssin, joka esiintyy toistuvasti prola-

miinimolekyyliessä. Menetelmä on entsyymi-immunologinen menetelmä, joka perustuu antigeeni-vasta-ainereaktioon. [4.]

Menetelmän kulku on yksinkertaisempi kuin sandwich ELISA:ssa. 96-kuoppalevyn kuopat on päällystetty gliadiinilla. Standardit ja näytteet sekä peroksidaasileimattu anti-geeni-konjugaatti eli yhteenliittymä lisätään samanaikaisesti. Näytteen tai standardin vapaa, ja kuopanpohjan sidottu gliadiini, kilpailevat vasta-aineen (peroksidaasi-konjugaatti) sitoutumispaikoista inkuboitessa. Vapaa peroksidaasi-vasta-aine -konjugaatti poistetaan pesemällä ja entsyymisubstraatti (ureaperoksidi) ja värin aiheuttaja (tetrametyylibentsidiini) lisätään kuoppiin samanaikaisesti ja inkuboidaan, jolloin sitoutunut entsyymi-konjugaatti sitoutuu tetrametyylibentsidiinin kanssa aiheuttaen sinisen värin. Reaktion pysäytysreagenssi aiheuttaa sinisen värin muuttumisen keltaiseksi. [4; 26]

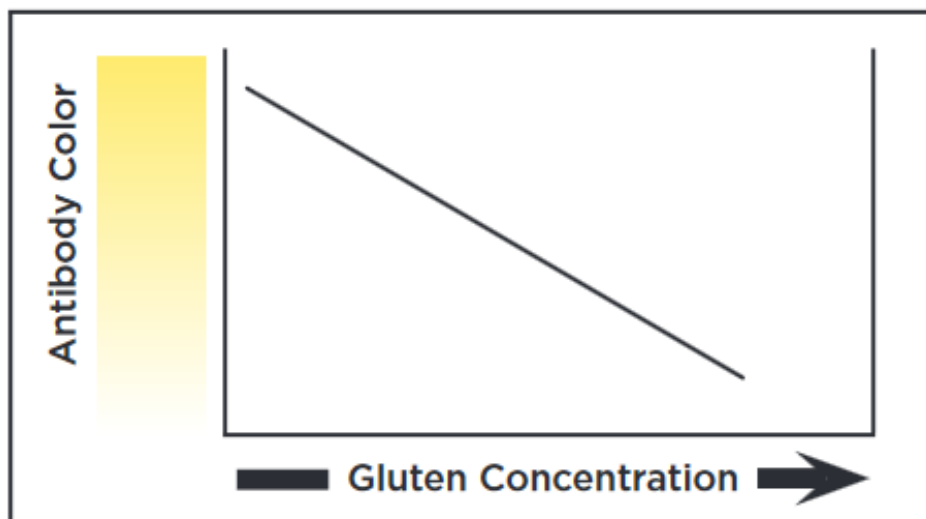


Kuva 6. Kuvassa esitetään gluteenittoman ja gluteenia sisältävän näytteen aikaansaamat reaktiot, kun ruskea neliö edustaa gluteenin gliadiini-antigeeniä ja vihreä kolmio R5-vasta-ainetta. Kuvapari i. esittää tapahtuvaa reaktiota kuoppalevyn kuopassa, kun näytteessä ei ole gluteenia. Kuvapari ii. puolestaan esittää tilannetta, jossa näytteessä on läsnä gluteenia. [26.]

Kuvassa 6 esitetään competitive ELISA:n toiminta kuoppalevyn kuopassa, kun ruskea neliö edustaa gluteenin gliadiini-antigeeniä ja vihreä kolmio R5-vasta-ainetta. Kuvapari i. on esitetty reaktio kuoppalevyn kuopassa, kun näytteessä ei ole gluteenia. Tällöin kaikki kuoppaan pipetoitu vasta-aine sitoutuu kuopan pohjalle sidottuihin gliadiini-

antigeeneihin. Kuvaparissa ii. puolestaan on esitetty tilanne, jossa näytteessä on läsnä gluteenia. Tällöin osa vasta-aineesta sitoutuu kuopanpohjan antigeeneihin ja osa näytteen vapaana nesteessä oleviin antigeeneihin. Kuopat pestään, jolloin kuvaparissa ii. vapaana nesteessä olevat vasta-aine-antigeenikompleksit poistuvat nesteen mukana. Jäljelle jäävien vasta-aineiden, joihin entsyymit on sidottu, määrä on kuvaparissa ii. pienempi kuin kuvaparissa i.. Pienempi määrä vasta-ainetta merkitsee vähemmän entsyymiä, joka pystytään havaitsemaan. Tämä näkyy vaaleampana keltaisen sävynä kuvaparissa ii. [26.]

Näytteiden mittaaminen tehdään spektrofotometrisesti aallonpituudella 450 nm heti pysäytysliuoksen lisäämisen jälkeen. Absorptio on käänteisesti verrannollinen gliadiinin pitoisuuteen näytteessä (vahva värireaktio merkitsee näytteen tai standardin olevan gliadiinipuhdas, kun taas heikko värireaktio kuopassa merkitsee suurta gliadiinipitoisuutta). Värireaktion vahvuuden riippuvuutta gluteenipitoisuuteen kuvataan kuvassa 7. [4.]



Kuva 7. Kuvassa esitetään kuoppalevyn kuopissa tapahtuvan entsyymi-värireaktion vahvuutta näytteen gluteenipitoisuuden suhteen. Y-akselilla keltaisen värin vahvuus (absorbtio (A)). X-akselilla gluteenipitoisuus kasvaa oikealle mentäessä. Kun näytteen gluteenipitoisuus kasvaa, keltaisen värin vahvuus heikkenee. [26.]

Competitive R5-ELISA -menetelmän huonoiksi puoliksi on mainittu mm. se että eristys tehdään R-Biopharmin patentoiman eristysliuos Coctailsolutionin sijaan 60-prosenttisella etanolilla. Tällöin kaikkia prolamiineja ei saada erotetuksi kuumennetuista elintarvikkeista, joiden proteiinit ovat denaturoituneet. Myös tulosten ilmoittaminen gluteenipeptideinä on ongelma, sillä niiden muuntaminen gluteeniksi (ppm) on hankalaa. [29; 30]

## 4 Validointi

Laboratorioiden tulee vastata töittensä laadunvarmistamisesta. Luotettavien tulosten saamiseksi menetelmiä ja laitteita validoidaan. Validoinnilla tarkoitetaan menetelmän tai laitteen testausta, jolla varmistetaan sen soveltuvuus tarkoitukseensa. Uuden menetelmän käyttöönotossa on syytä suorittaa validointi, joka lisää laboratoriossa tehtävien analyysien luotettavuutta. Validointi suoritettiin laboratoriossa käytössä olevan validointikaavan mukaan.

### 4.1 Osana laatujärjestelmää

KVYY ry on akkreditoitu testauslaboratorio, ja sen käyttämien menetelmien pätevyyden toteaa FINAS-akkreditointipalvelu. Validointi suoritetaan, kun halutaan osoittaa analyysimenetelmän luotettavuus, ja se on ehdoton edellytys sille, että menetelmä voidaan osoittaa riittävän tarkaksi ja luotettavaksi. Validoinnin tuloksena saadaan tietoa menetelmän antamien tulosten totuudenmukaisuudesta sekä mittausepävarmuudesta.

Tarkastelun perusteellisuuden määrää se, kuinka hyvin menetelmä noudattaa kyseiseen analyysiin asetettua menetelmästandardia. Täysin standardin mukaisten menetelmien validointi vaatii harvempien laatutekijöiden tarkastelua, kun taas modifioidut standardimenetelmät tarvitsevat laajempia testejä. [36.] Analyysi tulee aina suorittaa samalla lailla kuin se on validoinnin aikana suoritettu. Tässä opinnäytetyössä validoitu menetelmä ei ole standardisoitu, mutta se on mm. AACCI:n hyväksymä menetelmä (38-55.01). Competitive ELISA -menetelmän validoinnin yhteydessä työstettiin uusi menetelmäohje, joka on lähes suora käänös valmistajan menetelmäkitille tekemästä ohjeesta. Sen mukaisesti suoritettuna analyysin pitäisi tuottaa tuloksia niiden virherajojen sisällä, jotka on validoinnilla asetettu.

Validointi sisältää suunnitelman, kokeiden toteutuksen, tulosten tilastollisen tarkastelun ja raportoinnin. Suunnitelmaan on koottu testit, joita aiotaan suorittaa. Menetelmä on validi silloin, kun se täyttää sille asetetut vaatimukset jokaisessa testissä. Jokaiselle osa-alueelle asetetaan hyväksymisrajat, joiden sisälle tulosten pitää asettua. Tuloksille tehdään tilastollinen tarkastelu ja niitä verrataan asetettuihin vaatimuksiin. Jos menetelmän toiminnassa havaitaan puutteita, ne pyritään korjaamaan, ja validointi suoritetaan tämän jälkeen niiltä osin uudestaan. Validoinnissa saadut tulokset kerätään talteen ja arkistoidaan, jotta niiden perusteella tehdyt johtopäätökset voidaan tarkistaa.

Validointiraportti on dokumentti, johon on koottu saadut tulokset ja niistä tehdyt arviot. Näitä dokumentteja tarvitaan, jotta menetelmälle voidaan hakea akkreditointia validoinnin jälkeen. [36.]

Validointi on osoitus menetelmän toimivuudesta, kun analysoija on ammattitaitoinen. Tämä ei yksin riitä takaamaan tulosten laatua, vaan koko analyysiketjun pitää olla laadullisesti katkeamaton ja jäljitettävissä näytteenotosta tulosten käsittelyyn asti. Validi menetelmä on merkittävä osa laatujärjestelmää, ja kuitenkin vain osa laadukkaiden vaiheiden summasta.

#### 4.2 Tutkittavat validointikriteerit

Kerätystä tilastodatasta haluttiin validoinnin päätteeksi selvittää joitain analyysin suorittamisen laatuun vaikuttavia tekijöitä. Nämä tekijät ovat validoinnin vähimmäisvaatimuksia, kun menetelmä halutaan akkreditoida. Samoja tekijöitä on tarkasteltu myös toista yrityksen käytössä olevaa ELISA-menetelmää validoitaessa. Näitä tekijöitä ovat

- mittausalue
- lineaarisuus
- herkkyys
- toteamis- ja määrittäysrajat
- tarkkuus eli systemaattinen virhe
- täsmällisyys ja toistettavuus eli mittausepävarmuus.

Mittausalueen määrittämiseksi analysoidaan sarja näytteitä, joilla on vaihteleva gluteenipitoisuus. Mittausalueen perusteella määritetään pitoisuusalue, jolla saavutetaan hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys. Lainsäädännöllinen raja gluteenittomalle tuotteelle on 20 mg/kg ja erittäin vähän gluteenia sisältävälle 100 mg/kg. Menetelmän käyttötarkoituksena on seurata näitä rajoja gluteenittomista tai vähägluteenisista tuotteista. Tästä johtuen mittausalueen yläosa ei ole analyttisesti merkittävä, vaan mittausalueen tulee käytännössä kattaa alue pienimmästä määritettävästä pitoisuudesta noin 200 mg/kg pitoisuuteen. Mittausaluetta ei näin ollen tarvitse arvioida tässä tapauksessa erikseen, vaan mittausalue tulee arvioitua muiden validointitoimenpiteiden yhteydessä.



Lineaarisuuden määrittämiseksi analysoidaan sarja standardinäytteitä halutulla mittausalueella. Saatujen tulosten avulla lasketaan regressiosuora pienimmän neliösumman menetelmällä. Kitin ohjeen mukaisesti kalibrintikäyrä ei ole lineaarinen mittausalueella. Näin ollen lineaarisuutta ei pyritä määrittämään.

Herkkyys on vaste, jonka konsentraation muutos aiheuttaa mittasignaalin. Herkkyys ilmaistaan kalibrintisuoran kulmakertoimen avulla. Herkkyys määritetään lineaarisuuden määrittämisen yhteydessä. Herkkyys on riippuvainen konsentraatioalueesta, mutta koska kuvaaja ei ole lineaarinen, joudutaan herkkyyden arviointitapaa mukauttamaan valitseviin olosuhteisiin. Tämä tehdään laskemalla absorption muutos konsentraatioyksikköä kohden.

Toteamis- ja määritysrajoja voidaan arvioida eri menetelmin. Toteamisrajalla tarkoitetaan matalinta tutkittavan aineen pitoisuutta näytteessä, joka voidaan havaita, muttei määritä tarkaksi arvoksi. Määritysrajalla tarkoitetaan sitä tutkittavan aineen pitoisuutta, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella. Määrittämällä lähellä arvioitua toteamisrajaa olevaa näytettä useita kertoja, myös rinnakkaisina, voidaan tuloksista laskea toteamisraja. Määritetään lähellä oletettua toteamisrajapitoisuutta olevaa näytettä 10 kertaa rinnakkaismäärityksenä ( $2 \times 10 = 20$  määritystä). Arvioidaan toteamisrajat ja vastaavat määritysrajat.

Tarkkuus on saadun analyysituloksen ja oikean arvon läheisyys. Se määritetään joko referenssimateriaalin tai saantokokeiden avulla. Tarkkuus voidaan määrittää myös vertaamalla saatuja tuloksia toisella menetelmällä tai laitteella saatuihin tuloksiin tai vertailukokeen tulosten avulla. Menetelmän tarkkuuden arvioimiseksi pyritään löytämään sertioidu materiaali. Muussa tapauksessa näytteet lähetetään menetelmän akkreditoineeseen laboratorioon testattavaksi.

Täsmällisyys kuvaa satunnaistekijöistä tulokseen aiheutuvaa virhettä eli mittauksen toistotarkkuutta. Täsmällisyyttä arvioidaan peräkkäin tehtyjen rinnakkaismääritysten avulla.

Toistettavuus tarkoittaa mittatulosten yhtäpitävyyttä, kun mittaukset tehdään lyhyin aikavälein samalla menetelmällä. Toistettavuutta kuvataan tulosten keskihajonnalla. Toteutetaan koesarja, jossa analysoidaan erilaisia tuntemattomia pitoisuuksia omaavia näytteitä. Jokainen näyte määritetään rinnakkaisina ja toistetaan 10 kertaa (yhteensä 20 tulosta/näyte). Saaduista tuloksista lasketaan kullekin näytteelle täsmällisyys ja toistettavuus.

## 5 Tarkoitus ja tavoitteet

KVYY ry Porilabilla on käytössä elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden tutkimiseen tarkoitettu, sandwich ELISA:an perustuva, R-biopharmin Ridascreen® Gliadin -kitti. Kitty on suunniteltu käytettäväksi useimpien elintarvikkeiden kanssa. Laboratorio tahtoi kuitenkin sen rinnalle saman valmistajan Ridascreen® Gliadin competitive -kitin, joka on suunniteltu erityisesti hydrolisoitujen ja fermentoitujen elintarvikkeiden analysoimiseen.

Työn tarkoituksena oli validoida gluteenia elintarvikkeista tunnistava, uusi analyysimenetelmä jo olemassa olevan menetelmän rinnalle. Uuden menetelmän pitäisi antaa tarkempia tuloksia fermentoituja tai hydrolysoituja elintarvikkeita analysoitaessa. Validoinnin avulla pyrittiin varmistamaan menetelmän toimivuus akkreditointia varten. Menetelmän toivottiin parantavan tulosten tarkkuutta vanhaan menetelmään verrattuna. Validoinnin lisäksi insinööriyöhön kuului menetelmän työohjeen kääntäminen suomen kielelle ja muokkaaminen, sekä koulutuspäivän pitäminen laboratorion henkilökunnalle.

## 6 Materiaalit ja menetelmät

### 6.1 Näytteet

Uutta analyysia halutaan käyttää etenkin oluiden tutkimiseen. Tutkittaviksi näytteiksi valittiin sen vuoksi neljä erityyppistä markkinoilla olevaa kolmosolutta. Oluet pyrittiin valitsemaan siten, että niiden gluteenipitoisuudet olisivat mahdollisimman hyvin hajallaan tutkittavalla määrittämisalueella 5–100 ppm gluteenia. Oluenäytteet valittiin sattumanvaraisesti, eikä niiden gluteenipitoisuuksista ollut varmaa tietoa ennen työn aloittamista. Näytteiden valinnan apuna oli työtä yrityksessä ohjannut kemisti, joka arvioi ja valitsi lopulta halutut näytteet. Valitut näytemateriaalit ovat seuraavat:

- Oluet1 Gluteeniton pilsneri 4,5 %
- Oluet2 Tavallinen pilsneri 4,5 %
- Oluet3 Tavallinen lager 5,2 %
- Oluet4 Vehnäolut 4,6 %.

Oluet siirrettiin ennen ensimmäistä työkertaa lasisiin säilöpulloihin. Ennen siirtämistä oluet ravisteltiin hyvin ja vaahdon annettiin tasoittua. Myös siirtämisen aikana varottiin vaahtoamista, jotta kaikki näyte saatiin siirrettyä. Pullot numeroitiin ja säilöttiin kylmäsä +2–+8 °C:ssa.

## 6.2 Kitty

R-biopharmin Ridacreen® Gliadin competitive -kitti on tarkoitettu fermentoitujen ja hydrolysoitujen elintarvikkeiden gluteenipitoisuuden analysoimiseen. Kitille soveltuvia elintarvikkeita ovat esimerkiksi oluet, maltaat, humalat, tärkkelykset ja tärkkelyssiirapit, soijakastike ja hapanleipätaikina.

R-biopharmin Ridacreen® Gliadin competitive -kitti sisältää

- gliadiinilla päällystetyn kuoppalevyn, jossa on 12 x 8 kuoppaa.
- gliadiini-standardit, joiden pitoisuudet ovat 0 ppb, 10 ppb, 30 ppb, 90 ppb ja 270 ppb gliadiinia vesiliuoksessa, käyttövalmiina liuoksina
- peroksidaasi vasta-aine konjugaatin, 11-kertaisena konsentraattina
- substraatti+värinaiheuttaja-liuoksen
- pysäytysliuoksen (1 N rikkihappo)
- näytteen laimennosliuoksen, 5-kertaisena konsentraattina
- puskuroidun pesuliuoksen, 10-kertaisena konsentraattina.

Lisäksi tarvitaan seuraavat varusteet ja reagenssit:

- kuoppalevyn lukija
- sentrifugi ja kyvettejä
- magneettisekoittaja
- sekoittaja
- mikropipettejä 20 – 200 µl ja 200 – 1000 µl
- sopiva homogenisaattori (esim. Ultra Turrax)
- 60-prosenttinen etanoli, näytteiden esikäsittelyyn
- 4 M ja 0,1 M natriumhydroksidi
- ionivaihdettu vesi
- 60-prosenttinen etanoliliuos, jossa 10 % nestemäistä kalan gelatiinia, polyfenoleita sisältävien tuotteiden esikäsittelyyn (esim. oluet, maltaat ja humalat). [4.]

### 6.3 Laitteet

Työssä käytettiin Tecanin hydroflex -kuoppalevypesuria ja Tecanin sunrise -96-kuopan kuoppalevynlukijaa. Pesurissa on sekä pesu- että imutoiminnot, mutta vain pesutoimintoa käytetään. Kuoppalevy tyhjennetään manuaalisesti. Automaattisen pesurin käyttö nopeuttaa analyysin suorittamista ja parantaa tulosten yhdenmukaisuutta. [32.] Spektrofotometri sisältää normaalin absorbanssiin perustuvan lukuominaisuuden lisäksi ravistelu ja lämpötilansäätö toiminnot. Laite voi analysoida näytteen valonspektrillä 340–750 nm. [33.]

Jokaisella aineella on oma muuttumaton absorptiospektrinsä, jossa tietyllä aallonpituudella näyte absorboi voimakkaimmin ilman muiden aineiden häiritsevää absorptiota. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää kun mitataan spektrofotometrillä näyteaineen pitoisuutta ja puhtautta. Spektrofotometrinen mittaustapa perustuu Lambert–Beerin lakiin, jonka mukaan sähkömagneettisen säteilyn intensiteetti pienenee, kun säteily kulkee näyteaineen läpi. Spektrofotometrissä säteilylähteestä johdetaan valonsäde näytteen läpi ja muuttunut säteilyn intensiteetti mitataan. [34.]

Tecan Magellan on data-analyysiohjelma, joka mahdollistaa nopean ja helpon tulosten mittauksen ja käsittelyn. Se tukee Tecanin kuoppalevylukijoita ja on helppo käyttää [35]. Ohjelma laskee tulokset suoraan sille luodun menetelmän ja näytekartan avulla. Ennen opinnäytetyön aloittamista luotiin ohjelmaan menetelmä, jossa määritettiin standardien ja rinnakkaisten näytteiden paikat, standardien pitoisuudet sekä muutettiin laskentakaava sopivaksi käänteiselle mittaustavalle.

### 6.4 Vertailukoenäytteet

Sertifioitua näytemateriaalia ei löydetty etsinnästä huolimatta, joten näytteet lähetettiin toiseen samaa työtä tekevään laboratorioon testattaviksi. Testiä ei juuri ole tarjolla akkreditoituna menetelmänä, joten lähin sopiva laboratorio löytyi Saksasta. Lähetystä varten jokaista näytettä suodatettiin 100 ml:n gluteenipuhdaisiin muovipulloihin. Suodattukseen käytettiin hydrofiilista Sartorius Minisart single use syringe -ruiskusuodatinta, jonka aukkokoko oli 0,45 µm.

## 6.5 Työn esivalmistelut

### 6.5.1 Kalan gelatiiniliuoksen valmistus

Ennen itse gluteenipitoisuuden määrittämistä näytteet piti esikäsitellä uuttamalla, gluteeni-prolamiinien erottamiseksi. Olutnäytteet esikäsiteltiin kitin ohjeen mukaisesti valmistamalla 60-prosenttinen eristysliuos, johon liuotettiin kalan gelatiinia, niin että liuos oli sen osalta 10 prosenttista. Opinnäytetyön aikana kalan gelatiiniliuos valmistettiin neljä kertaa sen valmistusmenetelmän hiomiseksi.

1. Kalan gelatiini, ionivaihdettu vesi ja 99-prosenttinen etanoli sekoitettiin keskenään 100 ml:ksi.
2. Liuoksen pH säädettiin 8,5:een käyttämällä 4 M natriumhydroksidia.

### 6.5.2 Näytteiden esikäsitely

Näytteiden eristäminen tehtiin kitin ohjeen mukaisesti. Aluksi eristyksessä käytettiin huoneenlämpöistä, mutta muuten käsittelemätöntä olutta. Tulosten huomattiin kuitenkin heittelevän paljon, joten alun jälkeen olutnäytteet suodatettiin käyttämällä 0,45 µm:n aukkokoon ruiskusuodatinta.

1. Pipetoitiin 1 ml näytettä ja 9 ml etanoliliuosta koeputkeen.
2. Putkia sekoitettiin hyvin Vorteksilla ja ne laitettiin 10 minuutiksi ravistelijaan.
3. Näytteitä sentrifugoitiin 10 minuuttia ja supernatantti otettiin talteen näyteajoa varten.

### 6.5.3 Kitin sisältämien liuosten laimentaminen

Ennen näyteajoa laimennettiin kitin ohjeen mukaisesti osa työssä käytettävistä aineista. Näitä ovat pesuliuos, näytteenlaimennosliuos ja peroksidaasi-konjugaatti.

Laimennettiin pesuliuos 1:10, peroksidaasi-konjugaatti 1:11 ja näytteenlaimennosliuos 1:5 ionivaihdetulla vedellä.

#### 6.5.4 Pipetointikartan ja tietokoneen valmistelu

Suunniteltiin pipetointikartta Magellan-ohjelmaa varten. Pipetointikartta sisältää kaikki standardit ja näytteet rinnakkaisina. Yhdessä rivissä on kahdeksan kuoppaa, joiden käyttö pyritään maksimoimaan. Valittiin aiemmin menetelmälle luotu asetus pohja ohjelmasta. Valmisteltiin pesuri käyttöä varten huuhtelemalla järjestelmää ionivaihdetulla vedellä ja laimennetulla pesuliuksella. Kitin mukana tulevasta 96-kuoppalevystä valittiin haluttu määrä kahdeksan kuopan rivejä, jotka asetettiin kehykseen. Validoinnissa käytettiin useimmiten kolmea kuoppariviä.

Taulukko 1. Taulukossa on kuvattu validoinnissa käytetty pipetointikartta. Jokainen solu kuvaa yhtä kuoppaa. Näytteet 1–3 pipetoitiin kuoppiin neljänä rinnakkaisena, ja näyte 4 kahtena rinnakkaisena. Tämä johtuu siitä, että kuoppalevyn rivit pyrittiin hyödyntämään kokonaan, minkä lisäksi näytteen neljä gluteenipitoisuuden uskottiin ylittävän suurimman standardin pitoisuuden.

	A	B	C
1	Standardi1	Standardi5	Näyte4
2	Standardi1	Standardi5	Näyte4
3	Standardi2	Näyte1	Näyte1
4	Standardi2	Näyte1	Näyte1
5	Standardi3	Näyte2	Näyte2
6	Standardi3	Näyte2	Näyte2
7	Standardi4	Näyte3	Näyte3
8	Standardi4	Näyte3	Näyte3

Taulukossa 1 esitetään validoinnissa käytetty pipetointikartta. Kartasta nähdään, että kitin mukana tulleet viisi standardia on pipetoitu aina kuoppalevyn alkuun pitoisuusjärjestyksessä. Tämän jälkeen pipetoitiin näytteet rinnakkaisina. Kuoppien maksimaaliseksi hyödyntämiseksi näytteet 1–3 pipetoitiin neljänä rinnakkaisena. Valittiin näyte

neljä pipetoitavaksi vain kerran rinnakkaisena, sillä sen gluteenipitoisuuden oletettiin ylittävän määrittämisalueen rajan. Näin ollen olutnäyte neljä toimi työssä vain vertailupitoisuutena, eikä sen tuloksilla aiottu tehdä itse validointia. Eristetyt näytteet laimennettiin 1:50 aiemmin valmistetulla näytelaimennoksella.

## 6.6 Mittaukset

Työ toistettiin yhteensä 22 kertaa kuukauden aikana siten, että työkerrat sijoituivat tasaisesti koko kuukaudelle. Työtä tehtiin useampana päivänä viikossa ja välillä kahdesti päivässä. Mittaukset suoritettiin aina saman työohjeen mukaisesti [4].

1. Pipetoitiin kuoppiin 50 µl standardeja ja näytteitä pipetointikartan mukaisesti kahtena rinnakkaisena.
2. Pipetoitiin heti ensimmäisen pipetointikierroksen jälkeen kuoppiin 50 µl laimennettua peroksidaasi-vasta-aine-konjugaattia. Kuoppatelineessä olevia kuoppia sekoitettiin varovasti heiluttamalla ja annettiin inkuboitua puoli tuntia huoneenlämmössä.
3. Reagenssit kaadettiin pois kuopista ja kuoppakehys asetettiin kuoppalevypesuriin. Kuoppalevypesurin ohjelma pipetoi 250 µl laimennettua pesuliuosta kuoppiin, jotka tyhjennettiin. Tämä toistettiin kolme kertaa.
4. Kuopat taputeltiin kuiviksi paperia vasten ja kuoppiin pipetoitiin 100 µl substraattikromogeenia, joka aiheuttaa värimuutoksen kuopissa. Kuoppia sekoitettiin jälleen varovasti heiluttamalla ja annettiin inkuboitua 10 minuuttia pimeässä.
5. Lisättiin kuoppiin välittömästi 100 µl pysäytysliuosta, sekoitettiin varovasti heiluttamalla ja luettiin tulokset fotometrillä 450 nm:n aallonpituudella.

Ohjelma mittasi ja laski tulokset ja esitti ne tietokoneelle, josta ne tulostettiin parempaa tarkastelua varten. Ohjelma tulostaa halutusti dokumentteja fotometrin mittauksista.

Työssä kiinnostuksen kohteena olivat etenkin kuopista mitatut absorbanssit (A), standardikuvaaja sekä ohjelman laskemat kontrollien ja näytteiden gliadiinipitoisuudet. Ohjelma ilmoittaa gliadiinipitoisuuden µg/kg (ppb).

Lopullista tulosta laskettaessa otetaan huomioon laimennuskerroin 500 ja kerroin 2, jolla tulos kerrotaan gliadiinipitoisuuden muuttamiseksi gluteenipitoisuudeksi. Esimerkiksi: näytteen gliadiinipitoisuudeksi saadaan 10 µg/kg kalibroitisuoralta. Laimennuskerroin on ollut 500, joten gliadiinipitoisuudeksi saadaan 5000 µg/kg eli 5 mg/kg vastaten 0,0005 % gliadiinia. Tämä vastaa gluteeniksi laskettuna 0,001 % pitoisuutta eli 10 mg/kg (ppm) pitoisuutta.

Mittauksen ja koko työn onnistumista tarkasteltiin joka suorituskerralla tarkastelemalla pitoisuudeltaan tunnettujen standardien mitattuja pitoisuuksia ja kuvaajan muotoa. Vain työkerrat, joilla standardisuora oli onnistunut, otettiin mukaan lopulliseen validointiprosessiin. Kaikkien työkertojen näytetulokset kerättiin Exceliin datan muokkausta varten.



## 7 Tulosten käsittely ja esittely

Työn suorittamisesta saadusta datasta kerättiin tietoa Exceliin. Kerättäviä asioita olivat päivämäärä, standardisuoran onnistuminen, rinnakkaisten näytteiden gluteenipitoisuudet (ppb), eristyskerta ja eristysliuoksen valmistuskerta. Tulokset löytyvät liitteestä 1.

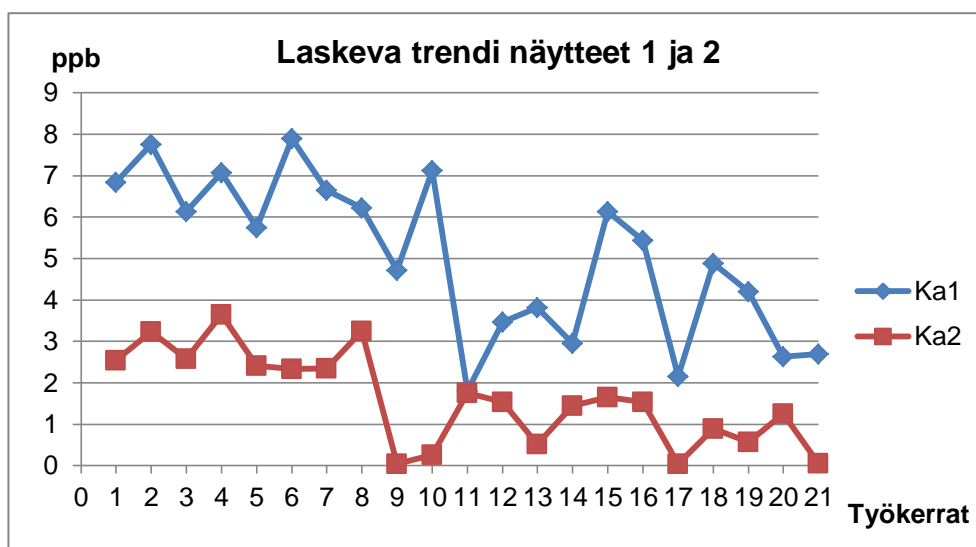
### 7.1 Tulosten käsittely Excelissä

Kaikki tilastodatan käsittelyt tehtiin kaikkien neljän näytteen tilastodatalle. Tavoitteena oli saada jokaiselle neljästä näytteestä 10 mahdollisimman hyvää rinnakkaistulosta, joilla validointi voidaan suorittaa.

Tulosten käsittely aloitettiin tarkastelemalla Exceliin kerättyä tilastodataa. Kaikki sellaiset työnsuorituskerrat, joilla standardisuora oli epäonnistunut, hylättiin. Tällaisia syitä olivat jonkun viidestä standardista antama väärä arvo tai rinnakkaisten näytteiden liian suuri hajonta. Suurimmassa osassa työsuorituksia standardisuora oli onnistunut. Tämän jälkeen laskettiin jäljellä oleville rinnakkaisille keskiarvot ja tehtiin kuvaaja kaikista keskiarvoista tarkastelua varten. Tämä toistettiin jokaiselle näytteelle.

Aluksi tuloksia käsiteltiin kahtena rinnakkaisena niin, että yhdellä työkerralla kaikkien neljän näytteen gluteenipitoisuudet saatiin selville rinnakkaisina kerran, minkä lisäksi näytteistä 1–3 saatiin tulokset vielä toisen kerran. Tätä havainnollistetaan taulukossa 1. Vaikka yhdellä työkerralla näytteet 1–3 pipetoitiin kaksi kertaa kahteen rinnakkaiseen kuoppaan, oli niissä käytetty näytelaimennos täysin samaa. Näytettä neljä käsiteltiin koko ajan kahtena rinnakkaisena, sillä se pipetoitiin vain kerran rinnakkaisena joka työkerralla.

Kun tarkasteltiin eri näytteiden kaikkien työkertojen keskiarvoista tehtyjä kuvaajia, huomattiin, että kuvaajissa näkyi laskevaa trendiä. Tätä havainnollistetaan kuvassa 8. Laskeva trendi johtui luultavasti samojen näytteiden käytöstä pitkällä aikavälillä, jolloin näytteiden gluteenipitoisuus laski hieman ajan myötä. Tämän vuoksi alussa ja lopussa tehtyjen työkertojen pitoisuuserot olivat huomattavia. Kuvassa on esitetty vain näytteet 1 ja 2, vaikka myös näytteen kolme käyrä oli laskeva, sillä näytteet 1 ja 2 ovat pitoisuuksiltaan melko lähellä toisiaan. Näytteen 3 gluteenipitoisuus on huomattavasti suurempi kuin näytteillä 1 ja 2, joten käyrä sijaitsi kuvassa selkeästi korkeammalla, mikä heikentäisi käyrien yksi ja kaksi havainnollisuutta.

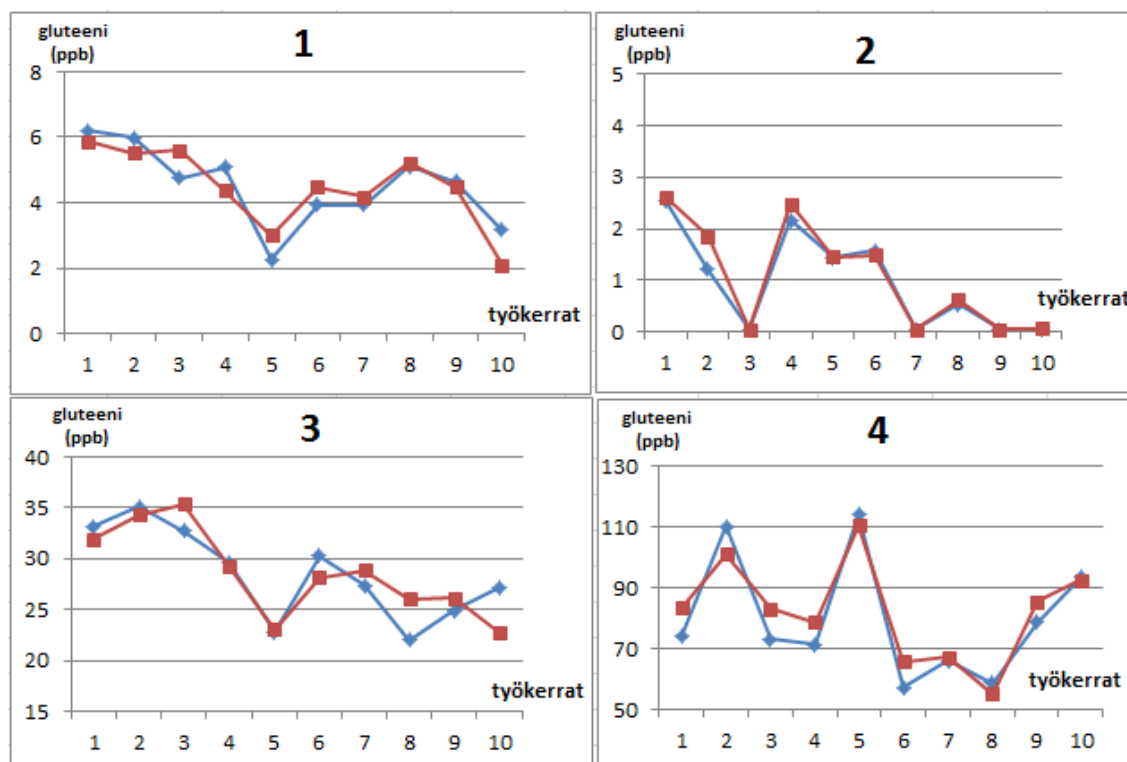


Kuva 8. Kuvassa on kuvattu näytteistä yksi (sininen) ja kaksi (punainen) saaduista gluteenipitoisuuksista tehtyjen käyrien laskevaa trendiä aikavälillä 20.10.–22.11.2016.

Näyte neljä poikkeaa muista näytteistä, sillä sen gluteenipitoisuus on moninkertainen niihin verrattuna ja saadut arvot heittelevivät enemmän kuin muiden. Tämä oli oletettavissa, sillä näyte neljä on vehnäolut, jossa on runsaasti sakkaa mukana. Sakka sisältää mm. jäänteitä vehnästä, minkä vuoksi se on erityisen gluteenipitoista. Sakan määrän täysin tasainen jakautuminen edes sekoitetussa näytteessä on epätodennäköistä etenkin kun näytettä jouduttiin laimentamaan reippaasti.

Käyriä tarkastellessa huomattiin, että samalla työkerralla saman näytteen rinnakkaiset vaihtelivat välillä suuresti. Tämä saattoi johtua pipetointinopeudesta, joka kehittyi ja parani työn loppua kohti. Myös kuoppalevyn kuoppien hienoinen epätasalaatuisuus saattoi vaikuttaa rinnakkaisten eroihin. Päätettiin käsitellä näytteitä neljänä rinnakkaisena, jotta laskevan trendin, pipetointinopeuden ja kuoppien epätasalaatuisuuden vaikutukset voitaisiin minimoida.

Jatkettiin tulosten käsittelyä niin, että näytteiden 1–3 tuloksia arvioitiin neljänä rinnakkaistuloksena. Jokaisen työkerran neljästä rinnakkaisesta karsittiin pois kaksi, niin että jäljelle jäivät ne kaksi, joiden gluteenipitoisuudet olivat lähinnä toisiaan. Näin saatiin parannettua rinnakkaishajontaa. Kaikkien jäljellejääneiden rinnakkaisten näytteiden gluteenipitoisuuksille laskettiin keskiarvot. Keskiarvojen perusteella karsittiin ne näytteet, joiden gluteenipitoisuuksien keskiarvo poikkesi huomattavasti kaikkien työkertojen keskiarvosta. Laskettiin rinnakkaisten näytteiden erotukset ja tehtiin kuvaaja, jossa molemmat rinnakkaiset näytteet näkyivät omana suoranaan. Karsittiin niiden työkertojen näytteet, joiden rinnakkaiset erosivat toisistaan huomattavasti.



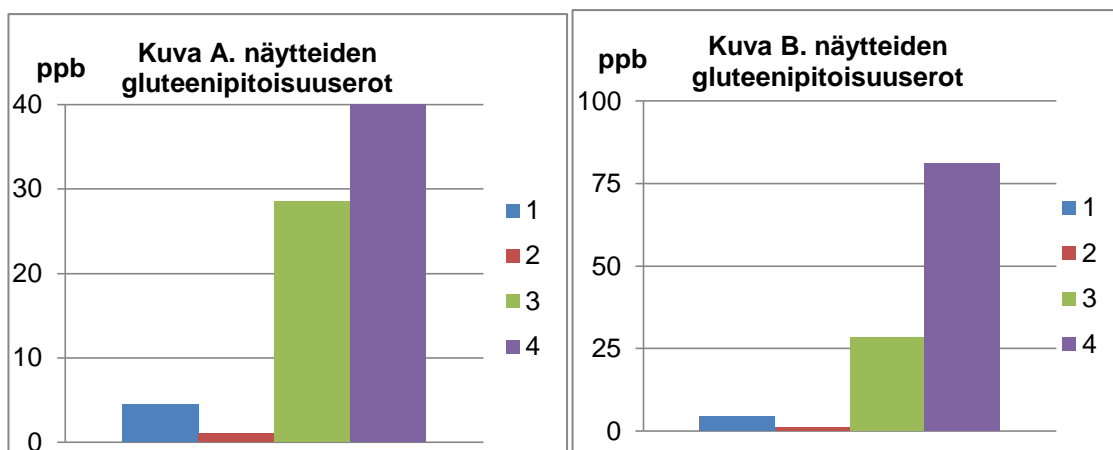
Kuva 9. Kuvassa esitetään neljän näytteen kuvaajat, kun näytteiden työkerrat on käsitelty ja karsittu kymmeneksi jokaiselle näytteelle. Y-akselilla on kuvattuna gluteenipitoisuus (ppb) ja x-akselilla työkertojen määrä. Sininen ja punainen käyrä kuvaavat rinnakkaisia tuloksia kunakin työkertana.

Karsittiin vielä tuloksia niin, että kaikilla näytteillä oli jäljellä kymmenen gluteenipitoisuuden arvoa rinnakkaisineen. Kuvassa 9 esitetään kaikkien neljän näytteen kuvaajat, kun näytteiden työkerrat on käsitelty ja karsittu kymmeneksi jokaiselle näytteelle. Kuvaajissa on käyrät erikseen molemmille rinnakkaisille, jotta voidaan havainnoida rinnakkaisten tulosten eroja. Jäljelle jääneet tulokset ovat työsuorituksista onnistuneimmat, ja niiden suorituksessa on havaittavissa vähiten virheitä ja häiriötekijöitä.

Kun lopullisia tuloksia havainnoidaan, huomataan, että näytteiden 1–3 trendeissä näkyy edelleen laskeva suunta. Näytteen neljä trendi puolestaan heittelee edelleen. Tulosten karsiminen ja rajaaminen eivät siis ole muuttaneet niiden luonnetta merkittävästi. Kuvan 9 kuvaajista voidaan myös havaita, että näytteiden rinnakkaiset ovat suurimmaksi osaksi pitoisuuksiltaan lähellä toisiaan.

Kun tarkastellaan näytteiden välisiä pitoisuuseroja, voidaan todeta, että näytteiden yksi ja kaksi gluteenipitoisuudet ovat alhaisia verrattuna muihin kahteen. Tämä voidaan havaita kuvasta 9. Näytteiden yksi ja kaksi pitoisuudet pysyvät melko hyvin samalla alueella koko käyrän ajan laskevasta trendistä huolimatta. Tämä selittyy sillä, että pitoi-

suudet ovat niin pieniä (lähellä toteamisrajaa), jolloin myös tulosten välinen hajonta on pienempi. Näytteet yksi ja kaksi voidaan tulosten perusteella todeta gluteenittomiksi.



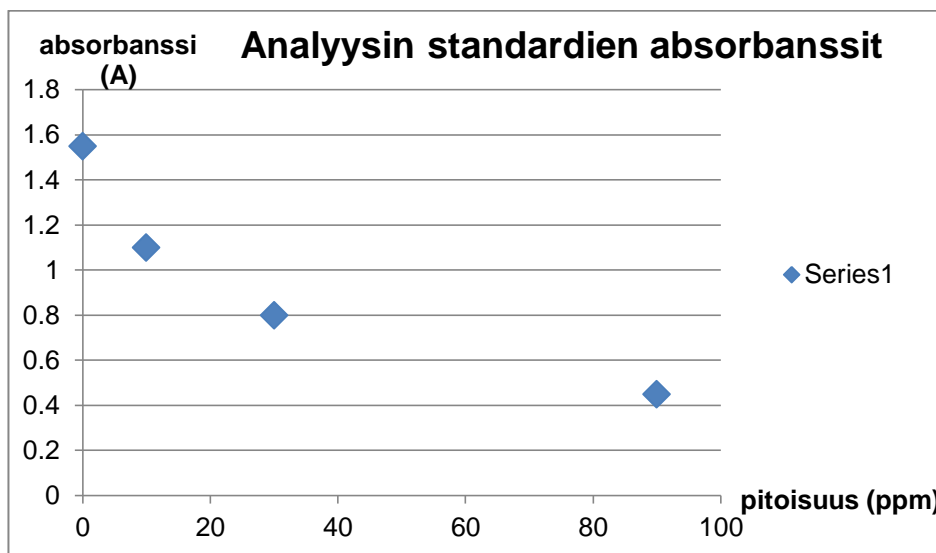
Kuva 10. Kuvissa A ja B on esitetty kaikkien neljän näytteen keskimääräiset gluteenipitoisuudet. Pitoisuuksiltaan pienempien näytteiden havainnollisuuden parantamiseksi kuvassa A näytteen neljä kolumni ei näy kokonaisuudessaan. Kuvassa B kaikkien näytteiden pitoisuudet näkyvät normaalisti.

Näytteen kolme gluteenipitoisuus on selvästi korkeampi kuin näytteiden yksi ja kaksi, mutta kaukana näytteen neljä gluteenipitoisuudesta. Se on tulosten perusteella vähä-gluteeninen. Kuvasta 10 nähdään että näytteessä neljä on selvästi enemmän gluteenia kuin muissa näytteissä. Lisäksi näyte neljä on laimennettu 1:2500 eikä 1:50 kuten muut näytteet. Pienempi pitoisuuksisten näytteiden gluteenipitoisuuden havainnollistamiseksi kuvassa 10 A asteikkoa on säädetty siten, ettei koko näytteen neljä pitoisuusalue mahdu kuvaan. Kuvassa 10 B gluteenipitoisuudet on esitetty kokonaisuudessaan.

## 7.2 Validoinnin tulokset

Mittausaluetta ja lineaarisuutta tarkasteltaessa todetaan, että lainsäädännöllinen raja gluteenittomalle tuotteelle on 20 mg/kg ja erittäin vähän gluteenia sisältävälle 100 mg/kg. Menetelmän käyttötarkoitus on näiden rajojen seuraaminen vähän tai ei ollenkaan gluteenia sisältävistä tuotteista. Näin ollen mittausalueen ”yläpäällä” ei analyttisesti ole merkitystä vaan mittausalueen tulee käytännössä kattaa alue pienimmästä määritettävästä pitoisuudesta noin 150 mg/kg pitoisuuteen. Mittausaluetta ei näin ollen tarvitse arvioida tässä tapauksessa erikseen vaan mittausalue tulee arvioitua muiden validointitoimenpiteiden yhteydessä.

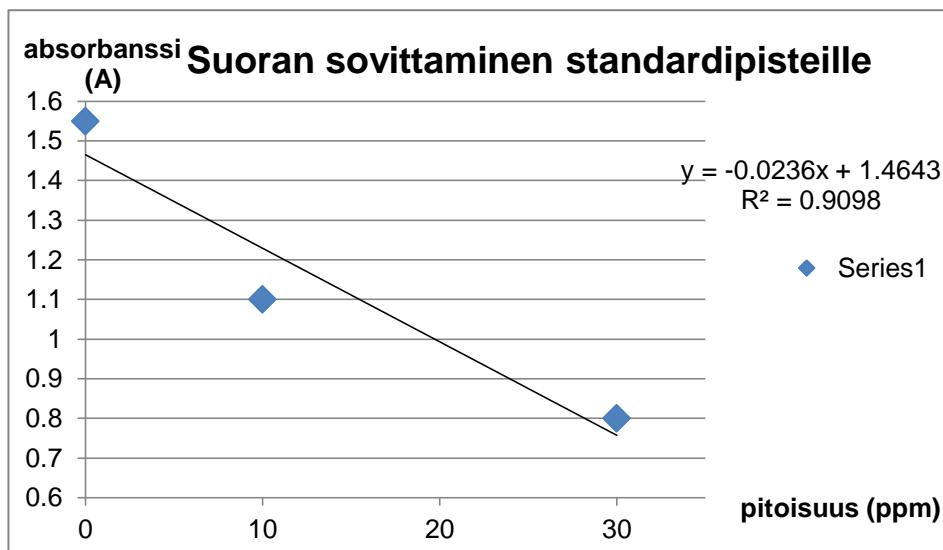
Kuoppalevylukijan (=fotometrin) oma ohjelma laskee kuvaajan. Standardikuvaajien selitysasteet olivat keskimäärin luokkaa 0,9. Näitä ei voi pitää erityisen hyvinä selitysasteina normaaleihin epäorgaanisiin spektrometrisiin menetelmiin verrattuna, mutta menetelmän luonne huomioon ottaen voidaan tulosta pitää tyydyttävänä. Kalibrointi tehdään jokaisessa mittaussarjassa, jolloin voidaan eliminoida entsyymaattisen menetelmän luontaisia vaihteluita (entsyymin aktiivisuuden vaihtelut, reagenssien pipetointien aikaviive, kuoppalevyjen laadun vaihtelut, kuoppien pesujen vaihtelut). Reagenssien pipetointi tehtiin Finnpietillä yksitellen, joten tällä seikalla lienee jonkin verran vaikutusta kalibroinninkin onnistumiseen.



Kuva 11. Kuvassa esitetään työn standardinäytteiden pitoisuudet (ppm) ja niitä vastaavat absorbanssit Tecan sunrise kuoppalevylukijan mittaamina. Herkkyyttä arvioitaessa todettiin, ettei suora ole lineaarinen. Herkkyys laskettiin siksi sovittamalla suora standardien pitoisuusalueelle 0–30 ppm.

Herkkyyttä arvioitaessa todettiin, että kalibrointikäyrä ei ole lineaarinen. Tätä havainnollistetaan kuvassa 11. Lisäksi ollaan kiinnostuneita vain kalibrointikäyrän alkuosasta mitta-alueella 5–100 ppm, sillä tämä on analyysin määrittämisalue.

Laskettiin absorptio muutos konsentraatioyksikköä kohti tarkastelemalla standardien pisteitä 0 ppm, 10 ppm ja 30 ppm. Laskennassa käytettiin standardinäytteiden kuvaajasta otettuja absorptiolukemia. Kuvaaja esitetään kuvassa 12. Arvopareille tehtiin lineaarinen regressio sijoittamalla konsentraatioarvot suoran yhtälöön. Tämän perusteella keskimääräinen absorptiomuutos konsentraatiota kohti oli noin 0,23 A/10 mg/kg. Tätä voidaan pitää laboratorion laatu järjestelmän mukaisesti riittävänä herkkyyden tuloksena.



Kuva 12. Kuvassa esitetään työn standardipisteille sovitettu suora ja sen yhtälö. Herkkyys laskettiin sijoittamalla suoran yhtälöön standardien pitoisuudet 0 ppm, 10 ppm ja 30 ppm.

Toteamis- (LOD) ja määrittäysrajat (LOQ) voidaan laskea kaavoilla

$$\text{LOD} = 3 \cdot s_0, \text{ ja} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 3 \cdot \text{LOD} = 9 \cdot s_0, \quad (2)$$

kun  $s_0$  on näytteen kaksi keskihajonta.

$S_0$ -näytteenä käytettiin työssä näytettä kaksi, jonka gluteenipitoisuudet olivat tasaisesti alle toteamisrajan 5 mg/kg.  $S_0$ :ksi otettiin näytteen kaksi karsittujen tulosten keskihajonta (0,9 ppb gliadiinia). Kaikkien näytteitten keskiarvot sekä keskihajonnat on esitetty taulukossa 2.

Toteamisrajaksi voidaan arvioida 3 ppm ja määrittäysrajaksi 9 ppm sijoittamalla yhtälöihin  $s_0$ -arvo. Koska lainsäädäntöraja on 20 ppm, voidaan määrittäysrajan todeta riittävän käyttötarkoitukseen. Valmistajan ilmoittama pienin määritettävissä oleva pitoisuus on 5 ppm. Analyysimenetelmän pidempiaikaisessa käytössä voidaan olettaa määrittäysrajan tarkentuvan lähelle valmistajan ilmoittamaa pitoisuutta.

Taulukko 2. Taulukossa esitetään olutnäytteiden keskiarvot (ppm) ja keskihajonnat (ppm), kun näyterinnakkaiset on karsittu kymmeneen pariin jokaiselle näytteelle.

	olut1	olut2	olut3	olut4
K.arvo	4.5	1	28.6	81
K.hajonta	1.1	0.9	4.2	17.5

Tarkkuutta arvioitaessa jouduttiin toteamaan, että analysoitavalle matriisille ei pitkistä etsimisestä huolimatta löytynyt sertifioitua kontrollinäytettä. Työn suorittaminen oli kuitenkin aloitettava riippumatta sopivan matriisin löytymisestä. Vaihtoehtona mietittiin oman vertailumateriaalin tai spiking-testien tekemistä, mutta tähän soveltuvaa raaka-ainetta, jossa gluteeniketjut olisivat olleet pilkkoutuneita, ei ainoan vastaavan tuotteen valmistuksen loputtua ollut enää saatavilla.

Sen sijaan näytteet lähetettiin testattavaksi menetelmän akkreditoineeseen laboratorioon Saksaan. Näytteitä lähetettäessä tiedettiin, että ainakin kaksi näytteistä on gluteenipitoisuuksiltaan lähellä määritysalueen alapäättä, ja näyte neljä ylittää monin kerroin määritysrajan. Siksi oli yllättävää, että laboratorion tulokset kertoivat näytteen kolme ylittäneen määritysrajan, kun taas näytteen neljä gluteenipitoisuustulos oli gluteenittoman tuotteen rajalla. Todettiin, että näytteiden oli täytynyt sekoittua. Laboratorio ei kuitenkaan suostunut myöntämään sekoittumista, mikä heikensi laboratoriotulosten luotettavuutta.

Muuten näytteiden pitoisuustasot vastasivat melko hyvin validoinnissa saatuja pitoisuustasoja. Näyte kaksi alitti 5 mg/kg ja näyte neljä ylitti 135 mg/kg gluteenipitoisuuden saksalaisen laboratorion testeissä, kun näytteiden sekoittuminen oli korjattu järjestelemällä tulokset uudelleen. Näytteen yksi gluteenipitoisuus oli hieman korkeampi saksalaisen laboratorion testeissä, kuin tehdyssä koesarjassa. Näytteen kolme gluteenipitoisuus taas oli hieman matalampi, kuin koesarjan keskiarvo.

Vain yksi näytteistä, näyte kolme 3, oli selkeästi mittausalueella. Tästä näytteestä laboratorion tulosten keskiarvo oli 28,6 ja vertailutulos toisesta laboratoriosta oli 19,2. Tulosten eroissa on otettava huomioon, että vertailutulos on analysoitu 25.11.2016 ja validoinnin tulokset on kerätty 2.11.–22.11.2016, ja validointituloksissa on havaittavissa laskeva tren-

di. Laskevan trendin vuoksi 2.11. tehtyjen analyysien keskiarvo on 40,8 kun taas 22.11. tehtyjen analyysien keskiarvo on 21,9. Näiden tulosten välillä on 18,9 mg/kg ero, josta saadaan laskemalla päiväkohtaiseksi pitoisuuden laskuksi 0,94 mg/kg.

Jotta saataisiin vertailukoetulos vastaamaan koko mittausjakson tulosten keskiarvoa ja pystytään huomioimaan laskevan trendin vaikutukset mittausepävarmuutta laskettaessa, on vertailukoetulosta käsiteltävä kuin sen mittausajankohta olisi ollut mittaussarjan puolessavälissä. Tämä voidaan laskea yhtälöllä

$$19,2+(0,94*11,5)=30,06 \quad (3)$$

jossa vertailukoetulokseen 19,2 lisätään päiväkohtainen pitoisuuden lasku. Tämä lisäys tehdään 11,5 kertaa, jotta tulos edustaa sarjan puolivälissä mitattua tulosta (2.11.–25.11. 2016 välillä on 23 päivää, josta halutaan puolet). Näin saatu vertailutulos on lähellä mittaussarjan puolivälissä saatuja pitoisuusarvoja. Tämä tulos on analyysin systemaattinen virhe, jota käytetään mittausepävarmuutta laskettaessa.

Näytteiden tarkastelua jatkettiin Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) kehittämällä MUKit-ohjelmalla. MUKit on tietokoneohjelma, joka on laboratoriolle kehitetty mittausepävarmuuden arvioinnin työkalu. Sen laskenta perustuu Nordtest TR 537 -raporttiin. Analyysituloksen mittausepävarmuuden tunteminen on tärkeää tuloksen jäljitettävyyden eli vertailukelpoisuuden vuoksi. Mittausepävarmuuden arviointitavan yhtenäistämisen uskotaan parantavan laboratorioden välisten analyysitulosten vertailukelpoisuutta [37].



Taulukko 3. Taulukossa esitetään MUKit-ohjelmassa saadut mittausepävarmuuden tulokset. Ylimpänä on näyte yksi, sitten kaksi, sinisellä on korostettu näyte kolme, jota käytettiin mittausepävarmuuden laskemisessa ja alimpana on näyte neljä. Näytteiden määritysalueena käytettiin 5 –100 mg/kg. Oikeassa reunassa on esitetty jokaisen näytteen laboratorion sisäinen uusittavuus ( $u(Rw)$ ) ja menetelmän ja laboratorion poikkeama eli systemaattinen virhe ( $u(bias)$ ). Reunimmaisena on näytteiden laajennetut mittausepävarmuudet. Tätä näytteen 3 arvoa käytetään mittausepävarmuuden tuloksena.

<i>Analyzed Concentration Levels</i>							
	Limit Low	Limit High	Reproducibility Method*	Bias Method**	$u(Rw)$ (%)	$u(bias)$ (%)	Expanded Uncertainty (%)
	5	100	Control sample and ...	Certified reference ...	28,92	12,71	64
	5	100	Control sample and ...	Certified reference ...	95,58	21,93	197
▶	5	100	Control sample and ...	Certified reference ...	16,12	7,83	36
	5	100	Control sample and ...	Certified reference ...	23,17	7,14	49

Mittausepävarmuuden laskemisessa MUKit-ohjelmassa käytettiin Excelissä karsittuja näytetuloksia. Näytteiden data lisättiin yksitellen ohjelmaan, joka laski näytteiden prosentuaaliset keskihajonnat ja käytti niitä mittausepävarmuuden laskemiseen. Kaikkien näytteiden laajennetut mittausepävarmuudet on esitetty taulukossa 3. Ylimpänä on näyte yksi, sitten kaksi, sinisellä on korostettu näyte kolme, jota käytettiin mittausepävarmuuden laskemisessa ja alimpana on näyte neljä. Näytteiden määritysalueena käytettiin 5–100 mg/kg.

Kaksi näytteistä on pitoisuuksiltaan alle määritysrajan ja yksi jouduttiin validoinnin aikana laimentamaan, jotta siitä saataisiin tuloksia. Siten vain näyte kolme on selkeästi määritysalueella ja se voidaan arvioida tilastollisesti. Näytteen kolme mittausepävarmuutta laskettaessa käytettiin vertailuarvona lukua 30,06 (laskukaava 3), jossa on huomioitu mittauksissa ilmennyt laskeva trendi.

Taulukko 4. Taulukossa esitetään Mukit-ohjelmasta saadut mittausepävarmuustulokset näytteelle kolme. Mittausepävarmuus koostuu laboratorion sisäisestä uusittavuudesta ( $u(R_w)$ ) ja menetelmän ja laboratorion poikkeamasta eli systemaattisesta virheestä ( $u(bias)$ ). Lisäksi mittausepävarmuus on tapana kertoa kahdella, jolloin saadaan laajennettu mittausepävarmuus.

Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 16,12 \%$ $u(bias) = 7,83 \%$
Calculate combined standard uncertainty, $u_c$	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 17,92 \%$
Calculate expanded uncertainty, $U$	$U = 2 \cdot u_c = 36 \%$

Taulukosta 4 nähdään Mukit-ohjelman antamat tulokset näytteen kolme mittausepävarmuus laskelmille. Mittausepävarmuus on yhdistelmä laboratorion sisäisestä uusittavuudesta ( $u(R_w)$ ) ja menetelmän ja laboratorion poikkeamasta eli systemaattisesta virheestä ( $u(bias)$ ). Näytteen kolme suhteellinen mittausepävarmuus on validoinnin perusteella 17,92 %, josta kertomalla kahdella saatiin laajennettu mittausepävarmuus 36 %.

Tulosten perusteella voidaan arvioida, että laajennettu mittausepävarmuus on määrittämisrajasta 20 mg/kg asti n. 36 %. Korkeaa mittausepävarmuutta tarkasteltaessa on otettava huomioon, että validoinnin tulokset on kerätty 2.11.–22.11.2016, ja validointituloksissa on havaittavissa lievästi laskeva trendi. Jos laskevaa trendiä ei olisi, voidaan olettaa että mittausepävarmuus olisi pienempi. Mittausepävarmuus tulee varmasti pienentymään, kun analysoinnissa ei käytetä samoja näytteitä, jolloin yksittäisten näytteiden gluteenipitoisuudet eivät muutu. Lisäksi lähitulevaisuudessa tullaan saamaan parempia vertailutuloksia, kun menetelmästä käynnistetään kuluvaan vuonna 2017 vertailukokeet Euroopassa.

Mittaussarjan valmistuttua tehtiin näytteiden analysointi vielä sandwich-menetelmällä, jotta competitive ELISA -menetelmän antamien tulosten suuremmasta tarkkuudesta voitiin varmistua. Sandwich ELISA -menetelmällä näytteiden yksi ja kaksi gluteenipitoisuudet olivat molemmat alle 2 mg/kg ja näytteellä kolme 4,5 mg/kg. Nämä tulokset ovat selvästi alle competitive-menetelmällä mitattujen pitoisuuksien. Tulos osoittaa, että sandwich-menetelmällä ei pystytä analysoimaan luotettavasti hydrolysoitujen tai fermentoitujen elintarvikkeiden, tässä tapauksessa fermentoidun oluen, gluteenipitoisuuksia. Uuden menetelmän validointi ja käyttöönotto on näin osoitettu perustelluksi.

## 8 Johtopäätökset

Tämän insinöörityön tarkoituksena oli validoida Kokemäen vesistöjen vesiensuojeluyhdistyksen (KVVY ry) Porin yksikölle gluteenia elintarvikkeista tunnistava, uusi analyysimenetelmä jo olemassa olevan menetelmän rinnalle. Validoinnin lisäksi insinöörityöhön kuului menetelmän työohjeen kääntäminen suomen kielelle ja sen muokkaaminen työn aikana saamani kokemuksen avulla sellaiseksi, että yhdistyksen työntekijät pystyvät tekemään työtä ohjeen avulla. Tavoitteena oli myös pitää koulutuspäivä laboratorion henkilökunnalle työn ohjeistamiseksi.

Tavoitteet saavutettiin hyvin, sillä menetelmä on akkreditoitu ja otettu käyttöön yrityksessä. Menetelmästä saatiin kerättyä tarpeeksi tilastodataa validoinnin tekemiseen. Competitive ELISA -menetelmän antamien tulosten tarkkuutta vertailtiin sandwich ELISA -menetelmän antamiin tuloksiin analysoimalla näytteet molemmilla menetelmillä. Havaittiin, että sandwich-menetelmällä saadut tulokset ovat selvästi alle competitive-menetelmällä mitattujen pitoisuuksien. Tulos osoittaa, että sandwich-menetelmällä ei pystytä analysoimaan luotettavasti hydrolysoitujen tai fermentoitujen elintarvikkeiden, tässä tapauksessa fermentoidun oluen, gluteenipitoisuuksia. Uuden menetelmän validointi ja käyttöönotto on näin osoitettu perustelluksi ja competitive ELISA -menetelmä soveltuvaksi gluteenifragmenttien havaitsemiseen.

Mittausepävarmuus jäi validoinnissa hieman korkeaksi, ja sen laskemista vaikeutti luotettavan referenssidatan puuttuminen ja vertailukoetulosten epämääräisyys. Validointia voidaan kuitenkin pitää onnistuneena, ja laboratorio jatkaa työn kehittämistä ja seuraa tarkasti analyysin laatutekijöiden toteutumista. Laboratorio aikoo myös osallistua heti kuluvana vuonna vertailukokeisiin. Myös menetelmän työohje valmistui yhdistyksen käyttöön ja koulutuspäivä pidettiin henkilökunnalle suunnitellusti.

Jos aloittaisin työn tekemisen nyt uudelleen, tekisin lähes kaiken samalla tavalla. Yhtenä muutoksena yrittäisin tiivistää työkerrat lyhyemmälle aikavälille välttääkseni laskevan trendin gluteenipitoisuuksissa. Toisaalta oli hyvä, että tällainen vaikutus havaittiin, ja sitä voidaan ennaltaehkäistä tulevaisuudessa. Olisi ollut myös kokonaisuudessaan helpompaa, jos menetelmälle olisi löydetty referenssimateriaali. Tähän asiaan ei kuitenkaan voi vaikuttaa kovinkaan helposti, ja uskon meidän tehneen parhaamme mahdollisen materiaalin löytämiseksi.

Lisäksi minun olisi kannattanut aloittaa työn kokeellinen osuus analysoimalla näytteet sandwich ELISA -menetelmällä. Nyt tein sen vasta kun olin jo kerännyt tarpeeksi tilastodataa competitive ELISA -menetelmällä. Tämä ei haitannut, sillä sandwich-menetelmällä saadut tulokset tukivat competitive-menetelmällä saatuja tuloksia ja osoittivat, että uudesta menetelmästä on etua oluita tutkittaessa. Analysoisin kuitenkin näytteet sandwich ELISA:lla mieluummin heti työn alussa, jotta competitive ELISA:a tehdessäni näytteille olisi olemassa jotkin arvot, joiden avulla voisin arvioida tulosten onnistumista työn alkupuolella.

Lopputyötä tehdessä perehdyin laajasti ELISA-menetelmiin sekä keliakiaan ja sen vaikutuksiin. Koen saaneeni vahvaa asiantuntijuutta aiheista, jotka olivat minulle aiemmin tuttuja vain pintapuolisesti. Työtä tehdessäni minulla heräsi kiinnostus erityisesti immunologiaa kohtaan. Olisi hienoa saada työskennellä aiheen parissa jatkossakin. Uskon oppineeni paljon uutta niin laboratoriossa työskentelystä, tutkimustyöstä kuin tekstin- ja datanmuokkauksesta. Pääsin myös hyödyntämään kielitaitoani, mikä on aina hienoa.

## Lähteet

- 1 KVVY ry:n yleisesite vuodelta 2016. Verkkodokumentti. <[http://kvvy.fi/wp-content/uploads/2016/04/KVVY\\_yleisesite2016\\_nettiin](http://kvvy.fi/wp-content/uploads/2016/04/KVVY_yleisesite2016_nettiin)>. Luettu 2.11.2016.
- 2 Haas–Lauterbach, S. & Immer, U. & Richter, M., 2012. Gluten fragment detection with a competitive ELISA, Journal of AOAC international. Vol.95., s. 377–381.
- 3 Mäki, M. 2006. Kuinka keliakia syntyy? Teoksessa Mäki, M. & Collin, P. & Kekkonen, L. & Visakorpi, J. & Vuoristo, M., Keliakia. Duodecim, Helsinki.
- 4 Ridascreen® Gliadin competitive, R-Biopharm AG- lyhyt käyttöohje (14–09–22).
- 5 Tovoli, F. & Masi, C. & Guidetti, E. & Negrini, G. & Paterini, P. & Bolondi, L., 2015. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. World journal of clinical cases. 11/2015, s.275–284.
- 6 Duodecimin terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00026](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00026)>. Luettu 26.10.2016.
- 7 Mäki, M. 2006. Miten keliakia todetaan? Teoksessa Mäki, M. & Collin, P. & Kekkonen, L. & Visakorpi, J. & Vuoristo, M., Keliakia. Duodecim, Helsinki.
- 8 Keliakialiitto ry. Verkkodokumentti. <[https://keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/keliakia\\_sairautena/keliakia\\_ei\\_ole\\_allergia/](https://keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/keliakia_sairautena/keliakia_ei_ole_allergia/)>. Luettu 26.10.2016.
- 9 Kaukinen, K. & Collin, P. & Mäki, M., 2010. Keliakia–diagnostinen ja hoidollinen haaste. Duodecim. 126/2010, s.245–253.
- 10 Keliakialiitto ry. Verkkodokumentti. <[https://keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/keliakia\\_sairautena/esiintyvyys/](https://keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/keliakia_sairautena/esiintyvyys/)>. Luettu 26.10.2016.
- 11 Keliakialiitto ry. Verkkodokumentti. <[https://keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/keliakia\\_sairautena/](https://keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/keliakia_sairautena/)>. Luettu 26.10.2016.
- 12 Comino, I. & Moreno, M.L. & Real, A. & Rodriguez–Herrera, A. & Barro, F. & Sousa, C., 2013. The gluten–freediet: Testing alternative cerealstolerated by celiac patients. Nutrients. 10/2013, s. 4250–4268.
- 13 Day, L. & Batey, I.L. & Wrigley, C.W. & Augustine, M.A., 2004. Verkkodokumentti: Value added wheat CRC project report, <<https://ses.library.usyd.edu.au/bitstream/2123/2727/1/VAWCRC%20Report%2044.pdf>>.

- 14 Keliakialiitto ry. Verkkodokumentti. <[https://keliakialiitto.fi/liitto/gluteeniton\\_elama/tuotteet/pakkausmerkinnat/](https://keliakialiitto.fi/liitto/gluteeniton_elama/tuotteet/pakkausmerkinnat/)>. Luettu 26.10.2016.
- 15 Keliakialiitto ry. Verkkodokumentti. <<https://keliakialiitto.fi/liitto/merkit/>>. Luettu 1.12.2016.
- 16 Keliakialiitto ry. Verkkodokumentti. <[https://keliakialiitto.fi/liitto/merkit/yrityksille\\_gluteenittoman\\_tuotteen\\_merkki/merkin\\_hakeminen/](https://keliakialiitto.fi/liitto/merkit/yrityksille_gluteenittoman_tuotteen_merkki/merkin_hakeminen/)>. Luettu 1.12.2016.
- 17 Elintarvikevirasto. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/laboratoriotoiminta/eviran-hyvaksymat-laboratoriot/>>. Luettu 31.10.2016.
- 18 Elintarvikevirasto. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/laboratoriotoiminta/eviran-hyvaksymat-laboratoriot/hyvaksytyt-laboratoriot/elintarvikkeet/>>. Luettu 31.10.2016.
- 19 Elintarvikevirasto. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/valvonta/>>. Luettu 28.11.2016.
- 20 Elintarvikevirasto. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/elintarvikeryhmat/erityisruokavaliovalmisteet/vanhat-erityisruokavaliovalmisteet/gluteenittomat-ja-erittain-vahagluteeniset-elintarvikkeet/gluteenittomia-ja-erittain-vahagluteenisia-elintarvikkeita-koskevalainsaadanto/>>. Luettu 26.10.2016.
- 21 Elintarvikevirasto. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/valvonta/>>. Luettu 8.11.2016.
- 22 Elintarvikevirasto. Verkkodokumentti. <<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/ruoka-allergeenit/ruoka-allergia-ja--intoleranssi/>>. Luettu 11.11.2016.
- 23 R-Biopharm, Allergen detection methods. Verkkodokumentti. <<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens>>. Luettu 14.11.2016.
- 24 Kanerva, P. & Sontag–Strohm, T. & Lehtonen, P., 2005. Determination of prolamins in beers by ELISA and SDS–PAGE. Journal of the institute of brewing. Vol. 111, s.61-64.
- 25 Sino Biological Inc., ELISA encyclopedia. Verkkodokumentti. <<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction>>. Luettu 28.10.2016.
- 26 Deaton, J. & Labellarte, G. & Allen, D. & Franklin, E. & Goodwin, J., 2015. The use and limitations of the competitive ELISA to detect proteins used in protease

- enzyme fermentation applications. Verkkodokumentti. Deerland Enzymes. <[http://deerlandenzymes.com/wp-content/uploads/2015/10/DE\\_ELISA\\_whitepaper.pdf](http://deerlandenzymes.com/wp-content/uploads/2015/10/DE_ELISA_whitepaper.pdf)>. Luettu 14.11.2016.
- 27 Thermofisher scientific. Verkkodokumentti. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#>>. Luettu 28.10.2016.
- 28 Sino Biological Inc.. Verkkodokumentti. <<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>>. Luettu 28.10.2016.
- 29 Thompson T., Mendez E., 2008. Commercial assays to assess gluten content of gluten-free foods: Why they are not created equal. J Am Diet Assoc. 108/2008, s.1682-1.
- 30 Thompson, T., 2/2011, Glutenfree dietitian website. Verkkodokumentti. <<http://www.glutenfreedietitian.com/assessing-the-gluten-content-of-foods-sandwich-elisas/>>. Luettu 25.11.2016.
- 31 Thompson, T., 2012, Glutenfree dietitian website. Verkkodokumentti. <<http://www.glutenfreedietitian.com/beer-why-it-is-so-hard-to-assess-fermented-and-hydrolyzed-products-for-gluten/>>. Luettu 25.11.2016.
- 32 Tecan hydroflex. Verkkodokumentti. <[http://lifesciences.tecan.com/products/reader\\_and\\_washer/microplate\\_washers/hydroflex](http://lifesciences.tecan.com/products/reader_and_washer/microplate_washers/hydroflex)>. Luettu 10.11.2016.
- 33 Tecan sunrise ominaisuudet. Verkkodokumentti. <[http://lifesciences.tecan.com/products/reader\\_and\\_washer/microplate\\_readers/sunrise/specifications](http://lifesciences.tecan.com/products/reader_and_washer/microplate_readers/sunrise/specifications)>. Luettu 10.11.2016.
- 34 Heiskanen, N., 2016. Spektrofotometrin historiaa, toiminta ja sovelluksia—esimerkkinä klorofyllin määrittäminen. Verkkodokumentti. <[http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/ont/Heiskanen\\_N\\_2016\\_kandidaatintutkielma.pdf](http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/ont/Heiskanen_N_2016_kandidaatintutkielma.pdf)>. Luettu 14.11.2016.
- 35 Tecan magellan,. Verkkodokumentti. <[http://lifesciences.tecan.com/products/software/magellan\\_data\\_analysis\\_software](http://lifesciences.tecan.com/products/software/magellan_data_analysis_software)>. Luettu 14.11.2016.
- 36 Mäkinen, I.; Suortti, A-M.; Saares, R.; Niemi, R.; Marjanen, J. J. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki. Suomen Ympäristökeskus.
- 37 Suomen ympäristökeskus. Verkkodokumentti. <[http://www.syke.fi/fi-fi/Palvelut/Kalibrointipalvelut\\_ja\\_sopimusalaboratorio/MUkit\\_mittausepavarmuusohjelma](http://www.syke.fi/fi-fi/Palvelut/Kalibrointipalvelut_ja_sopimusalaboratorio/MUkit_mittausepavarmuusohjelma)>. Luettu 3.2.2017.

päivämäärä	Rinnakkaiset näytteet olut1		
	A	B	keskiarvo
20.10.2016	11.746	18.036	14.891
24.10.2016	6.322	7.3651	6.84355
	16.862	12.717	14.7895
26.10.2016	9.0832	6.4311	7.75715
	51.093	37.511	44.302
26.10.2016	9.333	17.864	13.5985
27.10.2016	39.143	26.677	32.91
	47.674	21.699	34.6865
	28.127	35.979	32.053
1.11.2016	37.47	79.542	58.506
	77.326	24.118	50.722
	85.677	212.28	148.9785
1.11.2016	8.1105	47.01	27.56025
	12.646	18.026	15.336
2.11.2016	6.3883	5.8834	6.13585
	7.932	6.2007	7.06635
2.11.2016	5.9747	5.5071	5.7409
	8.6435	7.9127	8.2781
3.11.2016	15.747	16.801	16.274
	21.609	25.083	23.346
7.11.2016	9.6943	10.264	9.97915
	16.709	17.029	16.869
7.11.2016	8.6428	7.1586	7.9007
	12.578	9.7483	11.16315
8.11.2016	8.5502	4.7509	6.65055
	6.8336	5.6139	6.22375
10.11.2016	5.0819	4.3575	4.7197
	6.856	7.4008	7.1284
10.11.2016	2.2549	1.351	1.80295
	3.9134	3.0139	3.46365
15.11.2016	3.9335	0.014885	1.974193
	4.4774	3.1616	3.8195
15.11.2016	3.9225	1.9743	2.9484
	8.592	4.1707	6.38135
17.11.2016	7.0306	5.2288	6.1297
	5.1218	5.752	5.4369
17.11.2016	2.7887	1.5276	2.15815
	5.766	12.226	8.996
21.11.2016	5.2881	4.4884	4.88825
	4.6341	3.7648	4.19945
22.11.2016	3.1739	2.086	2.62995
22.11.2016	3.5651	1.8267	2.6959

	=	standardisuora hyvä
	=	standardisuora huono
	=	eristys1 etanoli1
	=	eristys2 etanoli1
	=	eristys3 etanoli2
	=	eristys4 etanoli3
	=	eristys5 etanoli4



päivämäärä	Rinnakkaiset näytteet olut2		
	A	B	keskiarvo
20.10.2016	10.486	9.5116	9.9988
24.10.2016	9.7403	12.145	10.94265
	11.499	13.114	12.3065
26.10.2016	6.2665	10.23	8.24825
	33.756	29.211	31.4835
26.10.2016	12.926	16.258	14.592
27.10.2016	52.632	21.656	37.144
	24.106	10.29	17.198
	22.728	22.14	22.434
1.11.2016	6.1091	5,079 <sup>-006</sup>	6.1091
	79.169	26.055	52.612
	82.568	29.167	55.8675
1.11.2016	58.368	82.705	70.5365
	31.301	62.24	46.7705
2.11.2016	3.0373	2.0502	2.54375
	3.3959	3.0817	3.2388
2.11.2016	2.5481	2.6109	2.5795
	2.7817	4.5224	3.65205
3.11.2016	12.265	8.9138	10.5894
	19.192	16.596	17.894
7.11.2016	9.5826	5.4197	7.50115
	18.699	16.185	17.442
7.11.2016	3.4406	<min	3.4406
	4.2008	0.85065	2.525725
8.11.2016	2.9789	1.8543	2.4166
	3.4422	1.2162	2.3292
10.11.2016	2.6404	2.0673	2.35385
	3.7482	2.7406	3.2444
10.11.2016	<min	<min	0
	0.41248	0.11365	0.263065
15.11.2016	2.1721	1.3372	1.75465
	0.6012	2.4844	1.5428
15.11.2016	0.675	0.35478	0.51489
	1.4326	1.4628	1.4477
17.11.2016	1.3393	1.9591	1.6492
	1.5809	1.4826	1.53175
17.11.2016	<min	<min	0
	<min	1.7418	1.7418
21.11.2016	0.5259	0.61339	0.569645
	1.5494	0.94992	1.24966
22.11.2016	<min	<min	0
22.11.2016	<min	0.066031	0.066031

päivämäärä	Rinnakkaiset näytteet olut 3		
	A	B	keskiarvo
20.10.2016	101.35	88.955	95.1525
24.10.2016	17.432	13.898	15.665
	17.631	24.571	21.101
26.10.2016	29.903	42.172	36.0375
	44.911	50.264	47.5875
26.10.2016	57.467	73.458	65.4625
27.10.2016	47.115	48.246	47.6805
	59.317	39.343	49.33
	34.55	26.846	30.698
1.11.2016	33.13	19.333	26.2315
	117.12	94.666	105.893
	192.43	79.169	135.7995
1.11.2016	47.01	47.652	47.331
	110.95	104.86	107.905
2.11.2016	33.162	29.825	31.4935
	31.963	37.977	34.97
2.11.2016	41.962	44.961	43.4615
	55.938	50.47	53.204
3.11.2016	53.884	56.647	55.2655
	53.551	58.464	56.0075
7.11.2016	36.013	20.612	28.3125
	27.308	34.244	30.776
7.11.2016	35.126	16.721	25.9235
	34.285	42.88	38.5825
8.11.2016	24.257	20.081	22.169
	42.627	34.732	38.6795
10.11.2016	32.739	21.232	26.9855
	35.384	26.017	30.7005
10.11.2016	29.648	29.286	29.467
	33.975	30.198	32.0865
15.11.2016	25.513	23.02	24.2665
	26.481	22.804	24.6425
15.11.2016	25.202	28.154	26.678
	30.238	36.89	33.564
17.11.2016	27.345	28.85	28.0975
	32.564	38.037	35.3005
17.11.2016	33.714	26.068	29.891
	22.017	40.707	31.362
21.11.2016	28.158	26.131	27.1445
	30.506	24.95	27.728
22.11.2016	27.18	22.723	24.9515
22.11.2016	17.722	19.956	18.839

päivämäärä	Rinnakkaiset näytteet näyte 4		
	A	B	keskiarvo
20.10.2016	>max	>max	#DIV/0!
24.10.2016	>max	>max	#DIV/0!
	>max	>max	#DIV/0!
26.10.2016	>max	>max	#DIV/0!
	>max	>max	#DIV/0!
26.10.2016	>max	>max	#DIV/0!
27.10.2016	42.458	40.058	41.258
1:50	62.247	120.62	91.4335
1.11.2016	173.31	233.57	203.44
	204.02	262.54	233.28
1.11.2016	131.86	153.03	142.445
2.11.2016	74.076	83.346	78.711
2.11.2016	110.06	101.07	105.565
3.11.2016	114.57	103.03	108.8
7.11.2016	124.09	172.029	148.0595
7.11.2016	58.059	94.95	76.5045
8.11.2016	73.088	83.139	78.1135
10.11.2016	71.238	78.721	74.9795
10.11.2016	80.391	99.178	89.7845
15.11.2016	85.337	100.04	92.6885
15.11.2016	58.747	78.081	68.414
17.11.2016	64.959	97.289	81.124
17.11.2016	114.09	110.36	112.225
21.11.2016	57.216	65.784	61.5
22.11.2016	66.209	67.236	66.7225
	58.752	55.108	56.93
22.11.2016	78.755	85.43	82.0925
	93.307	92.652	92.9795